

Fremstilling av heterosykliske derivater av 2-metoksiøstradiol

Masteroppgave i farmasi

Mai 2011

Hoan Vu Nguyen



**Seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for farmasøytisk
kjemi ved Farmasøytisk institutt, Det matematisk-
naturvitenskapelige fakultet**

UNIVERSITETET I OSLO

Sammendrag

2-metoksiøstradiol (2ME) viser potent anticancer aktivitet. Forbindelsen har antiangiogenetisk effekt samt anti-proliferativ og cytotoxisk aktivitet, som gir antitumor aktivitet i enkelte dyremodeller av solid tumor. Dessverre har denne forbindelsen en dårlig farmakokinetisk profil.

Det har blitt gjort en rekke SAR-studier på 17-posisjonen, men per i dag er det gjort få SAR-studier med heterosykler på denne posisjonen. Vi ønsker å undersøke om heterosykler øker den antiproliferative effekten av 2ME og vil blokkere metabolismen ved denne posisjonen.

Ved klikk-reaksjonen skulle det syntetiseres 1,4-disubstituerte-1,2,3-triazoler og 3,5-disubstituerte isoksazol analoger, i 17-posisjonen i 2ME, samt undersøke cytotoxiske effekten av disse.

Det ble forsøkt å syntetisere to isoksazolanaloger av 2ME, nemlig 2-metoksi-17- β -(3-(4-metoksifenyl)-isoksazol-5-yl)-østradiol og 2-metoksi-17- β -(3-(4-nitrofenyl)-isoksazol-5-yl)-østradiol. Dessverre ble ikke de to reaksjonene vellykket.

Derimot ble det syntetisert seks triazolanaloger av 2ME: 2-metoksi-17- β -(1-*para-tert*-butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**42**) med et utbytte på 28 %, 2-metoksi-17- β -(1-*para*-tolyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**44**) med et utbytte på 30 %, 2-metoksi-17- β -(1-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**46**) med et utbytte på 36 %, 2-metoksi-17- β -(1-*para*-metoksi-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**48**) med et utbytte på 15 %, 2-metoksi-17- β -(1-*para*-fluor-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**50**) med et utbytte på 26 %, 2-metoksi-17- β -(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**52**) med et utbytte på 12 %. Disse analogene skal evalueres biologisk.

Forord

Siste året av farmasistudiet som masterstudent har bydd på mange utfordringer. Mange av disse utfordringene har vært krevende. Dette har ført til mange nedturer. Men det er slik at når en når bunnen, finnes det bare en vei videre, og det er oppover. Takket være et godt støtteapparat rundt meg har jeg gått fra nedturer til oppturer.

Det er flere person jeg vil rette en stor takk til. Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder førsteamanuensis Trond Vidar Hansen for hans gode veiledning og tette oppfølging. Du har klart å holde min motivasjon oppe når ting var som verst. Takk for at du delte dine kjemiske kunnskaper med meg, og ikke minst takk for samtalene om NHL. Vancouver Canucks vinner nok i år.

Stipendiat Alexander Åstrand og postdoc. Anders Vik har også vært viktige bidragsytere. Jeg takker dere for all den hjelpen jeg har fått fra dere. Uten dere ville jeg aldri klart å nå målet med masteroppgaven. Takk for at dere var tilgjengelig når jeg trengte hjelp.

Jeg vil også takke stipendiat Øyvind W. Akselsen, min veileder, for alle gode råd og opplæring på laboratoriet. Stipendiat Eirik Solum for å ha hjulpet meg helt fra starten. Ingeniør Atle Haugen for å ha bistått gledelig. Katrine Martinsen, min medstudent og min gode venn, for de veldig ”seriøse” diskusjonene. Du er en person som uten tvil er uvurderlig person for meg. Og ikke minst vil jeg takke avdelingsingeniør Iuliana Cezarina Aldea Johansen. Takk for all hjelpen, omsorgen og støtten jeg fikk fra deg.

En takk vil også rette til alle som utgjør legemiddelkjemigruppen. Dere har bidratt til trivsel og et godt arbeidsmiljø. Jeg vil aldri glemme dere!

Til slutt vil jeg takke mine venner og familier for støtten, og ikke min samboer Ly Kien Tang for omsorgen, støtten og tålmodigheten. Du var en viktig støttespiller og du vil alltid ha plass i mitt hjerte.

Oslo, mai 2011

Vu Nguyen

Denne oppgaven ble utført ved seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk Institutt, Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet ved Universitetet i Oslo

Liste over forkortelser

2ME - 2-Metoksiøstradiol

Al(OⁱPr)₃ - Aluminiumisopropoksid

Bcl-2 - B-celle lymfoma-2

Bcl-xl - B-cell lymphoma-extra large

bFGF - basisk fibroblast vekstfaktor

COMT - Katekol-O-metyl transferase

CuAAC - Kobber katalysert alkyn azid sykloaddisjon

CYP - Cytokrom P450

DIPEA - Diisopropyletylamin

EtOAc - Etylacetat

FDA - Food and Drug Administration

HMPTA - Heksametylfosfor-triamid

J - Koblingskonstanten

MOMCl - Metoksi metylklorid

PCC - Pyridiniumklorokromat

PDGF - Platederivert vekstfaktor

SAR – Struktur-aktivitets-forhold

***t*-BuOH** - *tert*-butanol

TsNCINa·3H₂O - Natriumkloroamin-Tolsyl-trihydrat

THF - Tetrahydrofuran

VEGF - Vaskulær endotel vekstfaktor

VEGFR – Vaskulær endotel vekstfaktor reseptor

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
2	Biologien om celler og kreftceller	3
2.1	Cellesyklusen	3
2.1.1	Stadiene under mitose	4
2.1.2	Cellesyklusens kontrollsystem	5
2.2	Apoptose	7
2.3	Kreft	9
2.3.1	Innledning	9
2.3.2	Tumorigenese	10
2.4	Mikrotubuli	12
2.4.1	Innledning	12
2.4.2	Mikrotubuli viser dynamisk ustabilitet	13
2.4.3	Tubulinhemmere	14
2.5	Angiogenese	15
2.5.1	Innledning	15
2.5.2	Antiangiogenetisk behandling	16
3	2-Metoksiøstradiol	19
3.1	Innledning	19
3.2	Farmakologiske egenskaper av 2ME	19
3.2.1	2ME og antiangiogenetisk effekt	19
3.2.2	2ME og tubulinhemmende effekt	19
3.2.3	2ME og induksjon av apoptose	20
3.3	Metabolisme	21
3.4	SAR studier av 2ME	23
3.4.1	SAR-studier på A-ringen	23
3.4.2	SAR-studier av B-ringen	26
3.4.3	SAR-studier av C-ringen	27
3.4.4	SAR-studier av D-ringen	27
4	Isoksazoler og triazoler	30
4.1	Innledning	30
4.2	3,5-disubstituert isoksazoler	30
4.3	1,4-disubstituert 1,2,3-triazoler	31
5	Syntesemetoder	32
5.1	Oppenaueroksidasjon	32

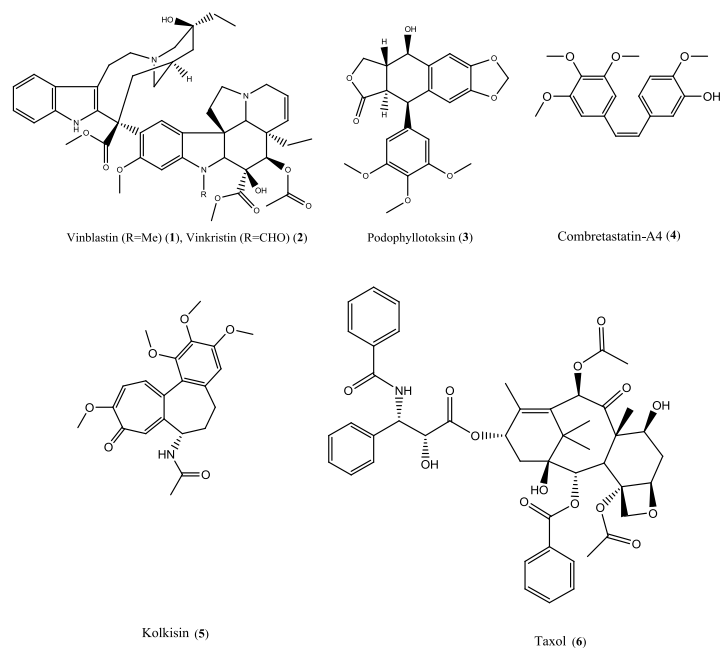
5.1.1	Innledning.....	32
5.1.2	MPVO	32
5.2	Klikk-reaksjoner	35
5.2.1	Innledning.....	35
5.2.2	CuAAC	36
5.2.3	One-pot kobber(I)-katalysert syntese av 3,5-disubstituerte isoksazoler.....	38
5.3	Grignardreaksjoner	39
5.4	Beskyttelsesgrupper.....	41
5.5	<i>Orto</i> -formylering	43
5.5.1	Innledning.....	43
5.5.2	Utviklingen av <i>Orto</i> -formyleringsmetoden	44
5.6	Mål for oppgaven	46
6	Resultater og diskusjon	47
6.1	Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol	48
6.1.1	Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol fra 2-metoksiøstradiol	48
6.1.2	Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol fra 17- β -etynyløstradiol.....	60
6.2	Forsøk på å syntetisere arylazider	64
6.3	Forbedring av CuAAC prosedyren.....	65
6.4	Syntese av triazolderivatene av 2ME	71
6.4.1	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para-tert</i> -butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol	71
6.4.2	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para</i> -tolyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	73
6.4.3	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	75
6.4.4	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para</i> -metoksi-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol	76
6.4.5	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para</i> -fluor-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	78
6.4.6	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para</i> -kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol	79
6.4.7	Forsøk på å syntetisere 2-metoksi-3-metoksimetyl-17- β -(1- <i>para</i> -kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol	81
6.5	Forsøk på å syntetisere 3,5-disubstituerte isoksazoler.....	82
7	Konklusjon	84
8	Videre arbeid	85
9	Eksperimentelt	86
9.1	Materialer	86
9.2	Analyser.....	86
9.2.1	Smeltepunktet	86
9.2.2	Tynnsjikt-kromatografi (TLC).....	86

9.2.3	Kjernemagnetisk ressonanspektroskopi (NMR).....	86
9.2.4	Infrarødspektroskopi (IR)	87
9.2.5	Væskechromatografi (HPLC)	87
9.2.6	Massespektroskopi (MS).....	87
9.3	Syntese av 2-metoksiøstron.....	88
9.4	Syntese 2-metoksi-3-O-metoksimetyl-østron.....	92
9.5	Syntese av 2-metoksi-3-O-metoksimetyl-17- β -etynyløstradiol	96
9.6	Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol.....	100
9.7	Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol fra 2-metoksi-østron	104
9.8	Forsøk på å syntetisere arylazider	106
9.9	Syntese av 17- β -(1- <i>para-tert</i> -butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	107
9.10	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para-tert</i> -butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol	110
9.11	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para-tolyl</i> -1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	115
9.12	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	120
9.13	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para</i> -metoksi-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	125
9.14	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para</i> -fluor-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol.....	130
9.15	Syntese av 2-metoksi-17- β -(1- <i>para</i> -kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol	135
9.16	Forsøk på å syntetisere 2-metoksi-3-metoksimetyl-17- β -(1- <i>para</i> -kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol	140
9.17	Forsøk på å syntetisere 3,5-disubstituert-isoksazol	142
9.18	Syntese av 3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroksybenzaldehyd	144
9.19	Syntese av 17- β -etynyløstradiol-2-karbaldehyd.....	147
9.20	Syntese av 3-metoksi-metyl-17- β -etynyløstradiol-karbaldehyd	149
10	Litteraturliste	151

1 Innledning

Kreft er et av de mest alvorligste helseproblemene i verden, og utvikling av nye legemidler mot kreft og mer effektive behandlingsstrategier, er områder av stor betydning i legemiddelutviklingen. Til tross for store vitenskapelige og teknologiske fremskritt i for eksempel kombinatorisk kjemi, er fortsatt forbindelser fra naturen en enorm bidragsyter for legemiddelforskningen i dag. Dette skyldes at det eksisterer mange biologiske aktive forbindelser i naturen. Innen klasse av anticancer midler er over 60 % av godkjente cytostatika avledet fra naturlige forbindelser. Naturprodukter vil dermed fortsatt være den beste kilden for nye ”lead compounds”^[1].

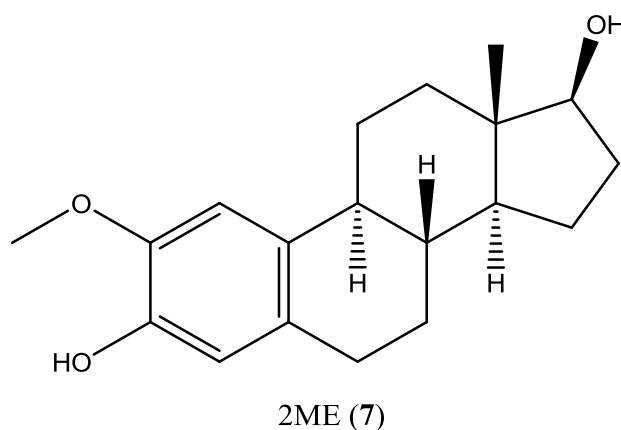
På 1950-tallet ble forbindelsene vinblastin (**1**) og vinkristin (**2**) ekstrahert fra planten *Catharanthus roseus* (Rosengravmyrt)^[2], og podophyllotoksin (**3**) ekstrahert fra planten *Podophyllum peltatum* (Maieple)^[3]. Disse forbindelsene viste seg å ha antineoplastisk effekt. Dette startet da jakten på forbindelser med anticancer effekter, fra plantekilder. USA National Cancer Institute (NCI) startet et omfattende program i 1960, hvor forskjellige planteforbindelser ble undersøkt^[4]. Dette førte til oppdagelser av mange nye forbindelser med cytotoksiske aktiviteter, dette inkluderer combretastatin-A4 (**4**) isolert fra den sør-afrikanske planten *Combretum caffrum*, kolkisin (**5**) isolert fra planten *Colchicum autumnale*, og taxol (**6**) isolert fra *Taxus* (barlind)^[5].



Figur 1.1: Eksempler på forbindelser fra naturen med anticancereffekt

Forbindelsene i **figur 1.1** tilhører en klasse kjent som tubulinhemmere, og de forstyrrer polymeriseringen og dynamikken av mikrotubuli. Dette vil forstyrre dannelsen av den mitotiske spindelen, som spiller en viktig rolle i cellesyklusen. Tubulinhemmere vil dermed stoppe cellesyklusen. Dette vil bli nevnt nærmere i kapittelet **2.4 Mikrotubuli**. Forbindelsene i denne klassen vil binde seg til ulike bindingssteder på tubulin. De ulike bindingssetene er oppkalt etter hvilke forbindelse som binder dem, som for eksempel bindingssetene for kolkisin, vinkaalkaloider, rhizoksin/maytansin, sulfhydrylgrupper. Forbindelser som binder seg på kolkisinssetet på tubulin blir ofte omtalt som destabiliserende forbindelser^[6].

En forbindelse som har denne tubulinhemmende effekten og binder seg til kolkisinssetet, er 2ME (7). 2ME er en endogen metabolitt av østradiol og viser potent anticancereffekt. I tillegg til å ha tubulinhemmende effekt, har den også antiangiogenetisk og apoptotisk effekt. 2ME kan dermed bekjempe kreften ved to forskjellige mekanismer: angripe tumorceller direkte og/eller angripe blodtilførselen^[7]. Siden forbindelsen er en endogen metabolitt vil den ha en dårlig farmakokinetisk profil. Det er særlig hydroksylgruppene på C-3 og C-17 som vil være utsatt for metabolisme, hvor de enten blir oksidert eller konjugert med sulfat eller glukuronsyre. 2ME vil allikevel være en attraktiv "lead compound" og muligens et effektivt anticancerlegemiddel for fremtiden.



Figur 1.2: 2ME er et potensielt anticancer-legemiddel

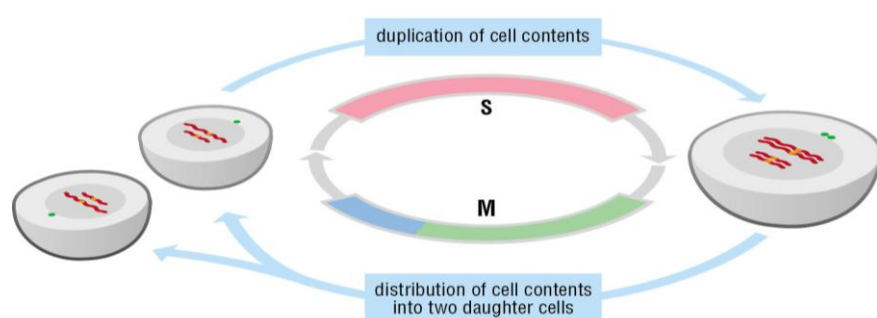
2 Biologien om celler og kreftceller

2.1 Cellesyklusen

Alle levende organismer, fra encellede bakterier til flercellede pattedyr, er produkter av gjentatte runder med cellevekst og deling. En celle reproduseres ved å gjennomføre en ordnet sekvens av hendelser der innholdet fordobles og deretter deler seg i to. Denne syklusen av dupliseringen og delingen, kjent som **cellesyklusen**, er grunnlaget for reproduksjonen for alle levende organismer. Detaljene i cellesyklusen varierer fra organisme til organisme, og til ulike tider hos den enkelte. Visse egenskaper er derimot universelle, blant annet må syklusen bestå av et sett av prosesser som en celle må utføre for å oppnå sin mest grunnleggende oppgave, nemlig å kopiere og videreformidle sin genetiske informasjon til neste generasjon.

Stadier av den eukaryotiske cellesyklusen er vanligvis definert på grunnlag av kromosomale hendelser. Tidlig i cellesyklusen vil DNA replikeres og kromosomene dupliseres. Dette skjer i **S-fasen** (S = DNA syntese), som er en av de to hovedfasene av cellesyklusen. Denne prosessen begynner på bestemte områder i DNA som kalles **replikasjonsopprinnelsen**. Dette er områder som er spredt i stort antall langs DNA-trådene. På disse stedene vil spesifikke proteiner åpne dobbelheliksen i DNA, og dette fører til at enzymer som er involvert i DNA-syntesen, kan bevege seg i begge retninger fra replikasjonsopprinnelsen, slik at DNA-trådene blir kopiert. Dupliseringen av kromosomene krever også økt syntese av proteiner, slik som histoner, som har som oppgave å pakke DNA i kromosomer. Deretter vil andre proteiner bli bundet langs de dupliserte kromosomene under S-fasen. Dette vil føre til en tett kobling, eller kohesjon mellom dem, og dannelsen av **søsterkromatider**.

Den andre store fasen av cellesyklusen er **M-fasen** (M = mitose), som vanligvis består av to hovedhendelser: deling av cellekjerne(**mitose**) og celledeling (**cytokinese**)^[8].



Figur 2.1: En skisse over cellesyklusen^[8].

2.1.1 Stadiene under mitose

Mitose produserer to celler hvor hver inneholder en identisk sett av morcellens kromosomer.

For å oppnå dette, må kromosomene utføre en presist koreografert sekvens av handlinger.

Mitose kan deles inn i fire stadier: **profasen**, **metafasen**, **anafasen** og **telofasen**.

I profasen, som er den første fasen i mitosen, vil kromatidtrådene pakkes inntil kompakte kromosomer. Hvert av kromosomene vil kopiere seg selv og danne **søsterkromatider**.

Søsterkromatidene vil være bundet til hverandre ved hjelp av en kobling som kalles **centromer**. Dette danner den karakteristiske X-formen med fire armer. På centromeren finnes det proteinstruktur som kalles **kinetokor**. Dette er en proteinstruktur hvor den mitotiske spindelen vil feste seg under mitosen. Hver av søsterkromatidene har denne proteinstrukturen.

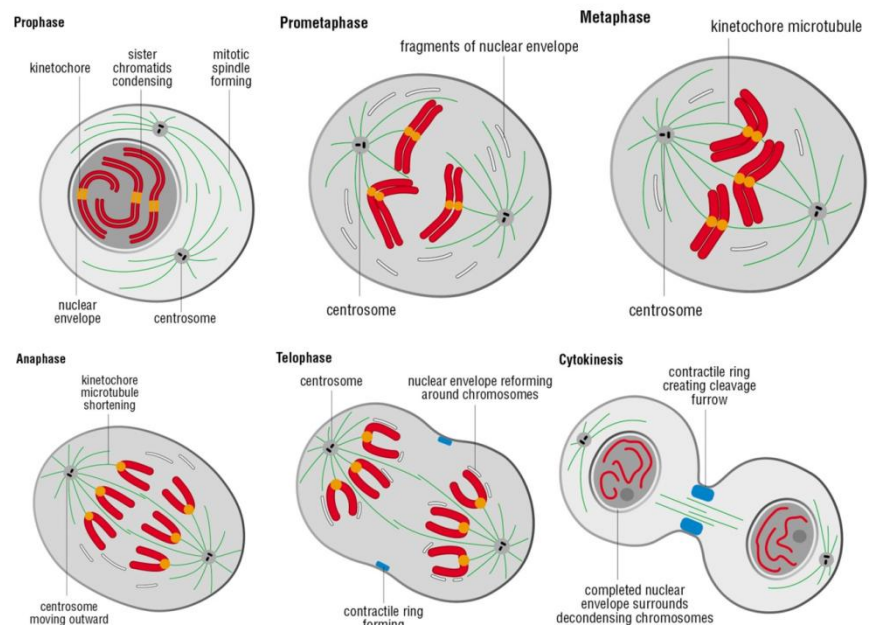
Samtidig som kromosomene pakkes inntil kompakte kromosomer, vil proteinstruktur kalt **centrosomer** begynne å bevege seg fra hverandre og til motsatte sider av kjernen. Centrosomen er et senter for produksjonen av den mitotiske spindelen, som har ansvar for segregeringen av kromosomene.

I prometafasen, som er det tidlige stadiet av metafasen, vil kjernemembranen brytes ned.

Kromosomene kan dermed interagere med de mitotiske spindlene i metafasen. Disse spindlene vil festes til kromosomene gjennom kinetokor, og kromosomene vil bli plassert i ekvatorialplaten.

I anafasen skilles de to kromatidene i kromosomene og beveger seg mot cellens poler ved hjelp av de mitotiske spindlene fra centrosomene. De separerte søsterkromatidene er nå kalt datterkromosomer.

I telofasen vil de nye kromosomparene nå sine poler i cellen. Kromosomene vil så tvinnes ut til kromatidtrådene, og rundt hvert av de to kromatidsettene vil det dannes en kjernemembran. Dette betyr at cellene har to kjerner hvor hver av dem inneholder en komplett kopi av



Figur 2.2: Skisse over kromosmale hendelser under mitosen^[9]

morcellen. I løpet av de siste stadiene av telofasen, vil cytokinesen forekomme. Cellen vil dele seg og det blir dannet to datterceller^[10].

2.1.2 Cellesyklusens kontrollsystem

I tillegg til S-fasen og M-fasen, har de fleste cellesyklusene to andre faser, kjent som **gap-faser**. Disse fasene finnes mellom S- og M-fasen. Den første gap-fasen, **G₁** forekommer før S-fasen, mens **G₂** forekommer før M-fasen. Gap-fasene sørger for at cellene får ekstra tid i celleveksten, som vanligvis krever mye mer tid enn det som trengs for å duplisere og segregere kromosomene. Gap-fasene fungerer også som viktige regulatoriske overganger, hvor progresjon til neste stadiet i cellesyklusen kan bli kontrollert av en rekke intracellulære og ekstracellulære signaler. Gap-fasene vil dermed bruke lengre tid enn M- og S-fasen.

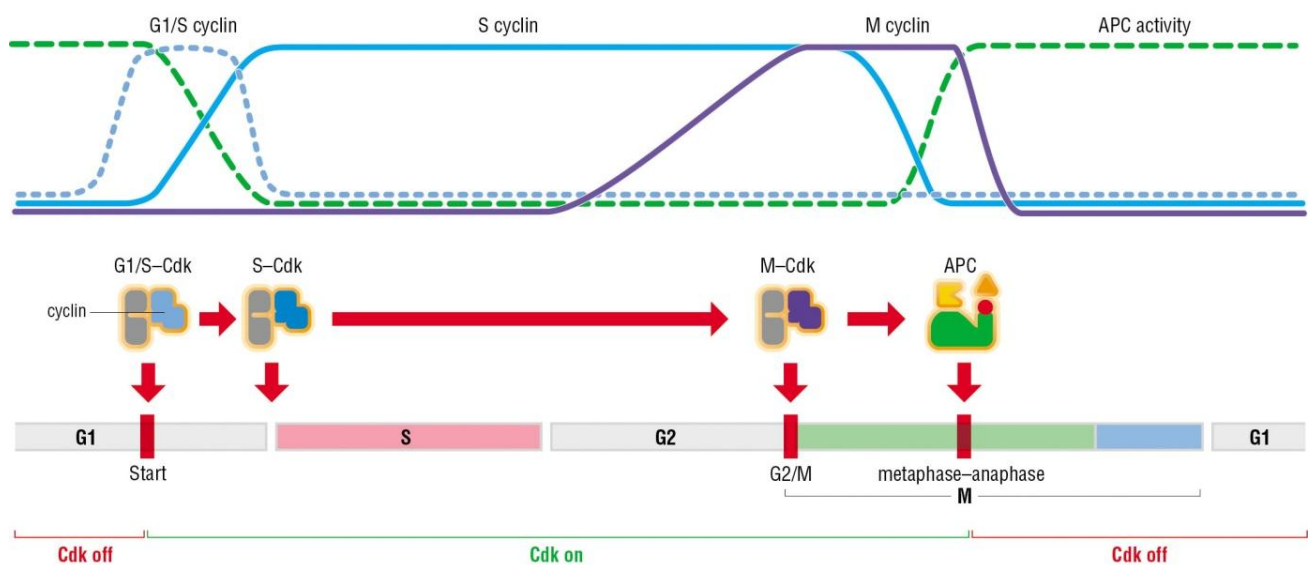
G₁ er en spesielt viktig reguleringsperiode siden det er her de fleste cellene enten fortsetter delingen eller går ut av cellesyklusen. I nærvær av ugunstige vekstforhold eller hemmende signaler fra andre celler, kan celler ta pause i lengre perioder i G₁-fasen eller være i en ikke-delende tilstand, som kalles for **G₀-fasen**. Under denne fasen vil cellen være i en dvale tilstand hvor cellesyklusen har stoppet opp. Celler kan imidlertid forlate G₀-fasen og gå inn i syklusen igjen, men dette krever at cellen får beskjed om dette fra intracellulære og/eller ekstracellulære signaler^[8].

De sekvensielle hendelsene i cellesyklusen er styrt av **cellesyklusens kontrollsystem**, som er et sett av signalmolekyler som både utløser og koordinerer viktige hendelser i cellesyklusen. Dette kontrollsystemet fungerer som en autonom biokjemisk klokke som er nøyaktig programmert til å starte hendelser i cellesyklusen i riktig rekkefølge og med bestemte intervaller. Dette vil sørge for at hver hendelse har nok tid til å bli ferdig før neste hendelse starter^[11].

Dette kontrollsystemet styrer maskineriet ved å aktivere og deretter inaktivere nøkkelproteiner og proteinkomplekser som starter eller regulerer DNA replikeringen, mitose, og cytokinese. Fosforylering etterfulgt av defosforylering er en av de vanligste måtene som brukes av celler til å endre aktiviteten av et protein. Fosforyleringen som kontrollerer cellesyklusen, er utført av et bestemt sett av **proteinkinaser**. Disse enzymene overfører en fosfatgruppe fra ATP til en bestemt aminosyre sidekjede på målproteinet. Effektene av fosforyleringen kan bli raskt reversert ved defosforylering, en reaksjon som utføres av et annet sett av enzymer kjent som **fosfataser**.

Kinaser som er en del av kjernen i cellesyklusens kontrollsystem, vil være i en inaktiv tilstand som blir aktivert i bestemte deler i cellesyklusen, før de raskt deaktiveres. Dermed stiger og faller aktiviteten til hver av proteinkinasene på en syklisk måte. Noen proteinkinaser blir for eksempel aktive mot slutten av G₁-fasen, og vil drive cellen inn i S-fasen. En annen proteinkinase vil bli aktiv rett før M-fasen og driver cellen inn i mitosen.

Det eksisterer et annet sett av proteiner i kontrollsystemet, som har ansvar for å aktivere og deaktivere kinasene til riktig tid. Disse proteinene er kalt for **cykliner**. Aktiviteten av kinasene er dermed avhengig av cykliner, og kinasene er dermed kjent som cyclin-avhengig-kinaser (Cdk). Navnet cykliner kommer av at konsentrasjonene endres i en syklisk vis i løpet av cellesyklusen. Forskjellige typer cykliner er produsert ved bestemte faser i cellesyklusen, og dette vil resultere i dannelsen av bestemt cyclin-Cdk kompleks som vil utløse forskjellige hendelser i cellesyklusen, slik som inngangen til S-fasen eller M-fasen^[12].



Figur 2.3: Økt konsentrasjon av cykliner vil føre til økt dannelse av cyclin-Cdk-komplekser. Dette kompleksset vil dermed utføre forskjellige hendelser i cellesyklusen. Komplekset blir inaktivt når cyclin konsentrasjonen synker^[11].

2.2 Apoptose

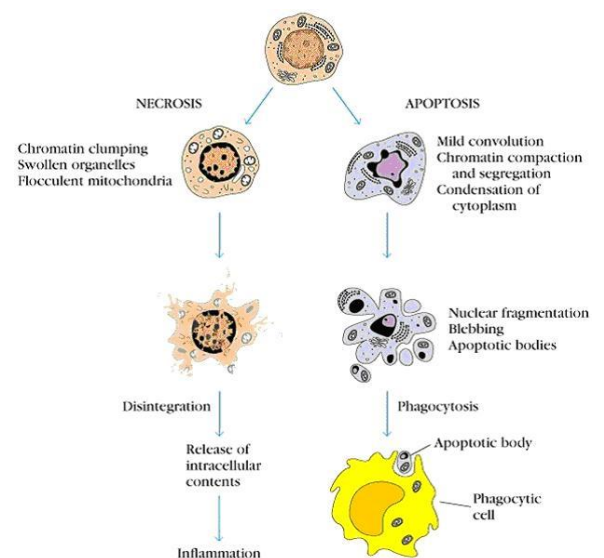
Et voksent menneske består av om lag 30 billioner celler, som alle stammer fra ett enkelt befruktet egg. Hvis denne første cellen deles i to, de to avkomcellene i fire, og så videre, ville det ta bare ca 45 runder av deling for å produsere det antallet celler som kreves for å lage et voksent menneske. Hver celle vil bli byttet ut i løpet av 2-ukersyklus. Grunnen til at flercellede organismer ikke blir uendelig stort, er på grunn av proliferasjonen av cellene blir balansert av celledød. Celler kan dø av to helt forskjellige grunner. En er tilfeldig, et resultat av mekaniske traumer eller utsatt for noen form for giftige substanser, og blir ofte referert som **nekrose**. Dette er den eneste typen død observert i encellede organismer. Den andre typen celledød er kontrollert, og er resultatet av en innebygd selvmordsmekanisme som kalles **apoptose** eller programmert celledød.

I celler som er skadet vil ATP-konsentrasjonen falle så lavt at Na^+ / K^+ -ATPase ikke lenger virker, og dermed vil ikke ione-konsentrasjonene være kontrollert. Dette fører til at cellene vil svelle og deretter sprekke. Celleinnholdet vil da lekke ut og forårsaker betennelse hos omkringliggende vevet.

Celler som dør av selvmord vil derimot krympe, og celleinnholdet blir pakket inn i små membran-bundete pakker. DNA blir hakket opp i små fragmenter. Den døende cellen modifiserer sin plasmamembran, og vil sende ut signaler som vil tiltrekke makrofager til den døende cellen.

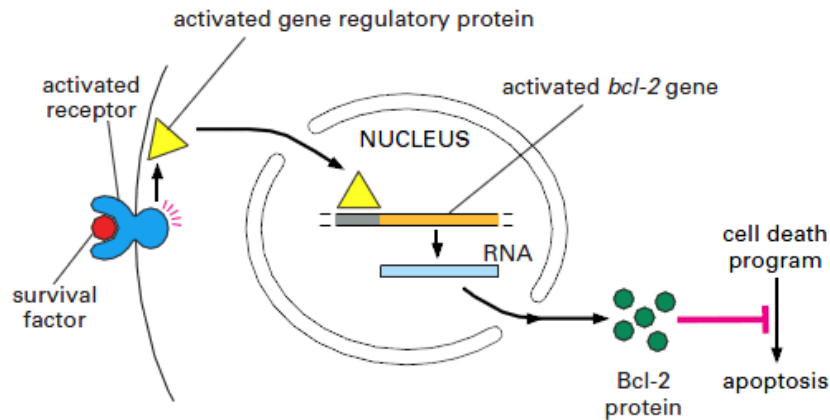
Makrofagene vil deretter fjerne cellen ved fagocytose, og samtidig vil de skylle ut cytokiner som vil hemme betennelsesreaksjoner. Fordelen som cellen har ved å bruke denne strategien er at ingen proteinsyntese er nødvendig for å aktivere den apoptotiske veien - alle komponentene er allerede tilstede. For eksempel hvis et virus infiserer en celle, og tar over all proteinsyntese, så kan cellen fortsatt begå selvmord, og dermed forhindre virusreplikasjon^[14].

Om en celle lever eller dør, er avhengig av signaler som fremmer eller hemmer celledød, som igjen er avhengig av behovene til organismen. I mange voksende vev, vil økning av celleantallet være avhengig av lokal produksjonen av ekstracellulære proteiner kalt **overlevelsesfaktorer**. Disse faktorene vil undertrykke apoptose i vevet. Overlevelsesfaktorer



Figur 2.4: En skisse over forskjellen mellom nekrose og apoptose^[13]

binder seg til reseptorer på celleoverflaten og starte intracellulære signalveier som blokkerer aktiveringen av det apoptotiske programmet^[15].



Figur 2.5: Når overlevelsesfaktorer binder seg til reseptoren vil det føre til transkripsjon av for eksempel proteinet Bcl-2, som er antiapoptotisk protein som vil hemme apoptose^[16].

Apoptose prosessen i cellene er komplisert og kan bli indusert via to ulike signalveier; der den ene skyldes ytre faktorer (eksterne signalveien) i form av dødsligander/dødsreseptorer. Den andre veien involverer mitokondriene (interne signalveien). Felles for de begge er aktivering av enzymene caspaser, som vil degradere viktige proteiner i cellen slik at cellen dør.

Ved eksterne signalveien vil ligand/reseptor interaksjon føre til konformasjonsendringer som fører til at caspasene blir aktivert. Ved interne signalveien vil apoptotisk signal føre til at mitokondriene skyller ut proteiner, som blant annet cytokrom c. Dette proteinet vil så videre aktivere caspase.

2.3 Kreft

2.3.1 Innledning

Menneskekroppen består av celler som er organisert i et tett sammensveiset samfunn kjent som vev. Hvert vev har en optimal størrelse, som er basert på kroppens behov, og bestemmes av antallet og størrelsen på hver celletype i vevet. For å oppnå og opprettholde denne idealstørrelsen, så vil de være under cellens kontrollsystem som vil sørge for å regulere dette ved hjelp av prosedyrer som deling, død og differensiering. Dette kontrollsystemet består av intracellulære og ekstracellulære faktorer som er produsert av nabocellene. Cellene er også tett forbundet til det vevet de tilhører, noe som vil hindre at cellene i vevet vil invadere andre og forstyrre dens funksjon.

Kreft er en sykdom der cellene ikke lenger responderer til dette kontrollsystemet som normalt styrer deres atferd i et vev. Kreftceller vokser og deler seg når de ikke burde, og dør ikke når de skal. De mister sine forbindelser til vevet og kan spre seg til andre vev^[17].

Etter hvert som kreftcellene fortsetter å dele seg, skjer det en opphopning av kreftceller i organet der den ukontrollerte veksten startet. Dette fører i dannelsen av tumorer/svulster. Prinsipielt kan tumorer enten være godartede (benigne) eller ondartede (maligne). Godartede tumorer vokser ikke inn i andre organer eller sprer seg. En godartet tumor kan sammenlignes med andre ufarlige knuter som bruskdannelser og vorter. En slik tumor behandles eller opereres dersom den forstyrrer kroppslige funksjoner eller forårsaker smerter. Ondartede tumorer kan derimot være farlige. Ondartede tumorer fortsetter å vokse, og skader nærliggende vev. De kan også spre seg til andre deler av kroppen via blod- og lymfesystemet. Ondartet tumor som ikke behandles i tide kan skape store problemer, lede til følgesykdommer og i verste fall døden^[18].

Utviklingen av en tumor er basert på naturlig seleksjon av nye genetiske egenskaper, som gir dem konkurransefortrinn ovenfor andre celler. De fleste kreftformene begynner ved en enkel genmutasjon som kan gjøre cellen i stand til å reproducere seg raskere enn andre celler i vevet. Tumorevolusjonen vil så fortsette når etterkommere av de opprinnelige muterte cellene skaffer seg ytterligere genetiske defekter, som tillater dem å overvinne de regulatoriske barrierer som normalt hindrer deres proliferasjon og overlevelse. Siden alle funksjoner i cellens atferd er styrt av et komplekst og robust regulatorisk nettverk, så trengs det vanligvis

flere genmutasjoner for å kunne bryte ned hver av barrierene som begrenser evnen til en utviklende tumorcelle å proliferere og spre seg^[19].

2.3.2 Tumorigenese

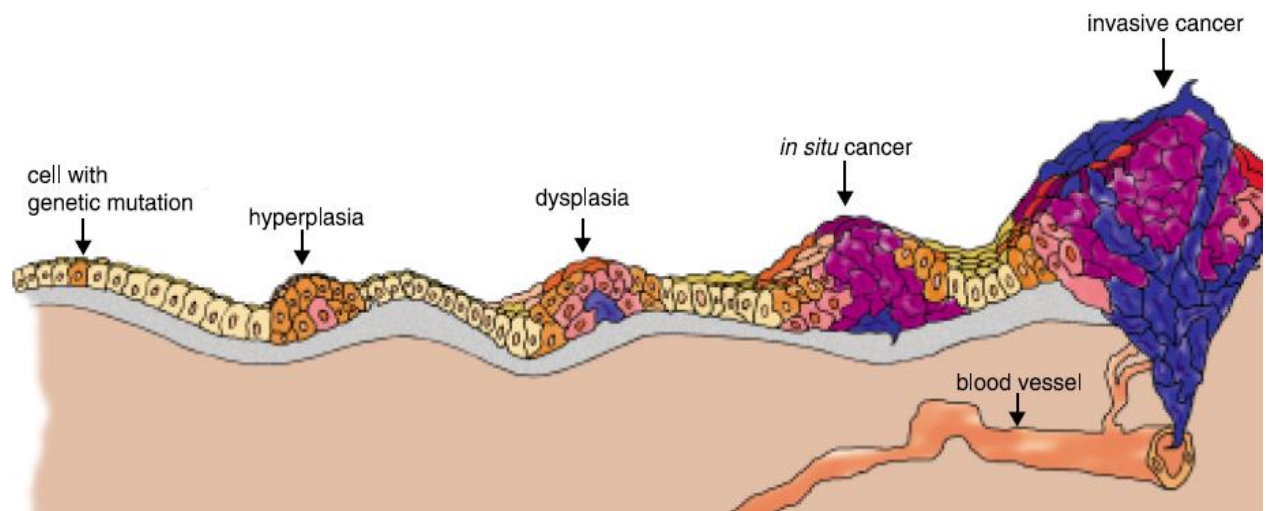
Veksten av en tumor kan betraktes som en evolusjonær prosess. Kroppen har flere kontrollsystemer som begrenser den unormale veksten, og hver av disse må overvinnes mot veien til maligniteten.

Malignt tumor inneholder mange genetiske forandringer, men disse har ikke skjedd alt på en gang. En tumor begynner med en celle som har fått en enkel mutasjon som gir det en fordel over sine naboer, for eksempel muligheten til å vokse raskere, bli ufølsomt for veksthemmende signaler, eller rett og slett å overleve når normale prosesser i kroppen forsøker å eliminere den. Dette kan føre til en progressiv endring i utseendet og oppførselen hos kreftcellene. De tidligste synlige endringene i vevsstrukturen er **hyperplasi** (se figur 2.6). Hyperplasi er en masse med høyt antall av unormale celler, men de har fremdeles lik form og organisering som normale celler.

Det neste stadiet av kreftutvikling, kalles **dysplasi**. Cellene har begynt å miste den normale organiseringen og utseendet som finnes i både normale og hyperplastiske vevet. Dysplastiske celler kan dele seg raskere enn sine hyperplastiske forløpere, og de deler også noen av de samme egenskapene som maligne celler.

Carcinoma er en avansert tilstand av dysplasi, og koloniene av disse cellene er omgitt og innesperret i vevet av en basalmembran, som er en del av ekstracellulære matrikse. Dette er en tilstand som kalles for *in situ* cancer.

Når cellene i disse koloniene utvikler evnen til å bryte ned basalmembranen og invadere omkringliggende vev, vil de som oftest begynne å spre seg til andre deler av kroppen. Denne prosessen kalles **metastasing**. Cellene spres først til nærliggende lymfeknuter og deretter til andre deler av kroppen. Kolonier av kreftceller kan bli etablert i andre organer og begynner å vokse. Disse koloniene kalles for **metastaser**. Dersom disse koloniene sprer seg til vitale organer, så kan de være livstruende ved at de forstyrrer funksjoner til organene^[20].



Figur 2.6: En skisse over tumorigenese^[20].

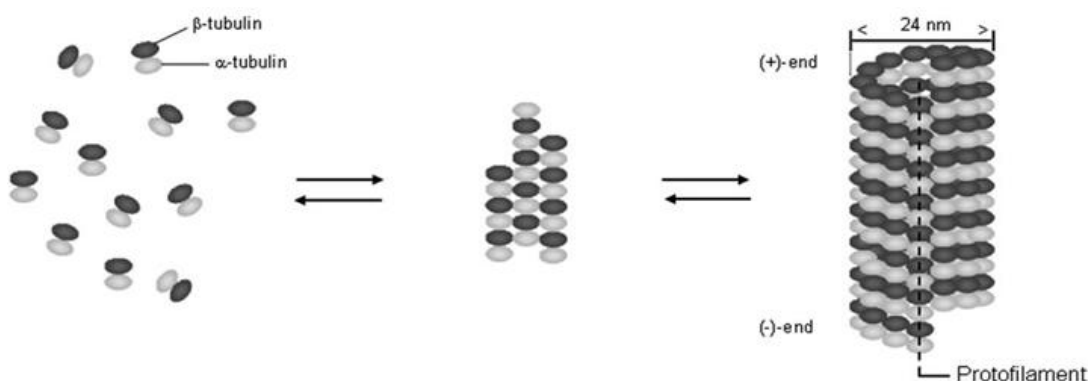
2.4 Mikrotubuli

2.4.1 Innledning

Mikrotubuli er lange, relativt stive hulrør av proteiner, som raskt kan løse seg fra et område og redannes igjen et annet sted. Mikrotubuli er sammensatt av et protein som kalles tubulin som består av to ulike subenheter, α - og β -tubulin. I det humane genomet er det minst fem α -tubulin og minst fem β -tubulin gener.

Mikrotubuli har fysiske egenskaper som tillater dem å delta i flere cellulære funksjoner. De deltar i dannelsen av formen på cellen via styring av retningen for påleiringen av cellulosefibrer i veggen. Mikrotubuli spiller også en viktig rolle i mitosen og meiosen, hvor de vil ha ansvar for segregeringen av kromosomer under disse prosessene. I tillegg er de en bestanddel i flageller og cilier i bevegelige celler, og sammen med aktinfilamenter er mikrotubuli en del av cytoskjelettet i cellen.

Mange α -tubulin/ β -tubulin-dimerer er satt sammen i kjeder som kalles **protofilamenter**. Mikrotubuli er laget av 13 protofilamenter som er ordnet parallelt til hverandre, og utgjør veggen av hulrøret. I hvert protofilament er tubulindimerene ordnet i en "hode-til-hale" ordning, $\alpha \beta \alpha \beta$ og så videre. Dette gir mikrotubuli en innebygd molekylær polaritet som gjenspeiles i måten den vokser. Tubulin subenheter adderes og elimineres raskere i den ene enden sammenlignet med den andre enden. Ved denne konvensjonen, er den rask voksende enden referert som **plussenden** og den sakte voksende ende som **minusenden**^[21].



Figur 2.7: Skjematisk presentasjon av mikrotubuli^[22].

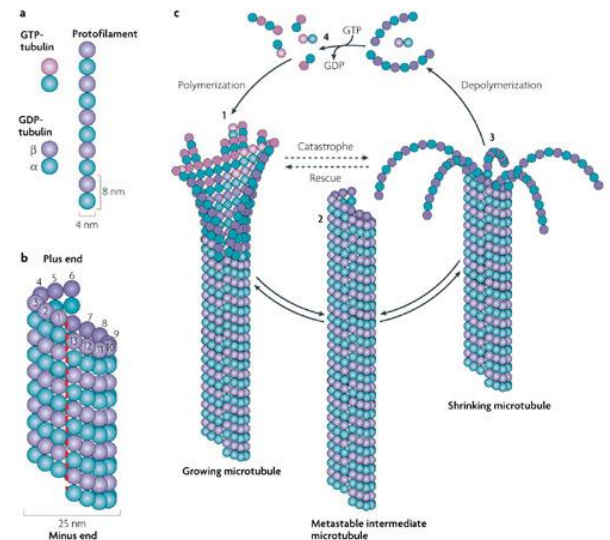
2.4.2 Mikrotubuli viser dynamisk ustabilitet

Dyreceller inneholder et nettverk av flere tusen mikrotubuli, hvor hver av dem har en diameter på 24 nm. Alle cellens mikrotubuli kan spores tilbake til en enkelt centrosom som finnes på overflaten av cellekjernen. Centrosomen inneholder hundrevis av ringformede struktur som er dannet av en annen type tubulin, **γ -tubulin**. Hver γ -tubulin fungerer som et sete hvor polymeriseringen av tubulin forekommer. α -Tubulin/ β -tubulin dimerer adderes på γ -tubulin i en spesiell formasjon, med det resultatet at minusenden av hver mikrotubuli er omgitt i centrosomer og veksten kjer kun ved plussenden.

Med en gang en mikrotubuli gjennomgår polymerisering, vil plussenden vokse utover. Etter hvert vil mikrotubuli gjennomgå en forandring som gjør at den begynner å krympe innover ved at subenheten på plusenden går tapt. Denne oppførselen kalles for **dynamisk ustabilitet**, og spiller en viktig rolle i funksjonen av den mitotiske spindelen^[21].

Hvordan mikrotubuli oppfører seg er sterkt påvirket av det faktumet at tubulin subenheter ikke bare er byggesteiner, men er også **GTPaser**:

enzymmer som binder seg til GTP og katalyserer dens hydrolyse til GDP og fosfat. Som mange GTPaser vil tubulin bruke energien som dannes i GTP bindingen og hydrolyser den ved å endre formen eller konformasjonen. Dette vil resultere i en endring i affiniteten til enden av tubulin, hvor GTP-tubulin har større affinitet enn GDP-tubulin. Dermed kan veksten og krympingen av mikrotubuli kontrolleres ved å endre de relative mengdene av GTP-og GDP-bindingen til tubulinenden av mikrotubuli.



Figur 2.8: Mikrotubuli vil oppleve dynamisk ustabilitet^[23]

Når polymerisering foregår raskt, adderes tubulinmolekylene raskere til mikrotubuli enn GTP kan hydrolyseres, noe som resulterer i at enden av mikrotubuli blir bestående av GTP-tubulin subenhetene som er bundet seg sterkt til hverandre. Dette vil føre i dannelsen av en "cap" på enden av mikrotubuli, kalt **GTP-cap**. Siden subenhetene i denne enden er sterkt bundet til hverandre, vil depolymeriseringen hindres.

Noen ganger vil tubulin på den frie enden av mikrotubuli hydrolysere sitt GTP før den neste tubulin har blitt addert, slik at den frie enden av protofilamentene nå består av GDP-tubulin.

Dette vil initiere depolymeriseringen av mikrotubuli. Når depolymerisering starter, vil den fortsette; mikrotubuli begynner å krympe raskt og kontinuerlig og kan i verste fall forsvinne helt^[23].

2.4.3 Tubulinhemmere

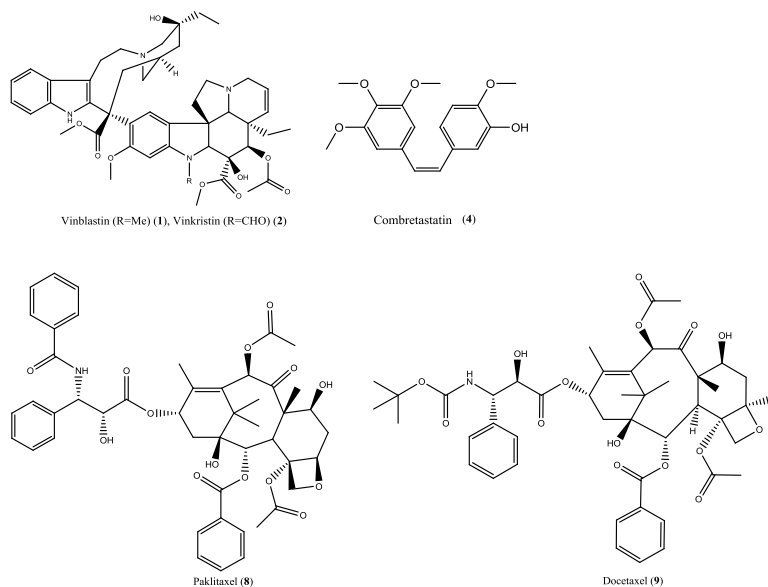
Når en celle dupliserer sitt DNA, vil hvert sett av kromosomer flyttes til motsatt ende av cellen ved hjelp av mikrotubuli. Ved å forstyrre denne funksjonen, vil det påvirke cellens evne i å dele seg. Forbindelser som har denne effekten er kjent som **tubulinhemmere**. Det er to forbindelser fra planter som er svært effektive hemmere av mikrotubuli.

Vinkristin som er isolert fra planten gravmyrt i Madagaskar^[2] og er en forbindelse som binder seg til tubulin og hemmer dens polymerisering i mikrotubuli. Dette vil hindre dannelsen av den mitotiske spindelen, og det vil føre til at cellyklusen stopper opp.

Taxoler som er isolert fra *Taxus* familien^[5], hemmer depolymerisering av tubulin. Dette vil gi samme effekt som vinkristin, nemlig å stoppe cellyklusen.

På grunnlag av disse to forbindelsene er tubulinhemmere inndelt inn i to grupper^[24]:

- Medikamenter som hemmer tubulinpolymerisering og fremmer depolymeriseringen. Vinblastin (1), vinkristin (2), combrestatin (4) finnes i denne gruppen
- Medikamenter som hemmer tubulindepolymerisering, for eksempel paklitaxel (8) og docetaxel (9) finnes i denne gruppen.



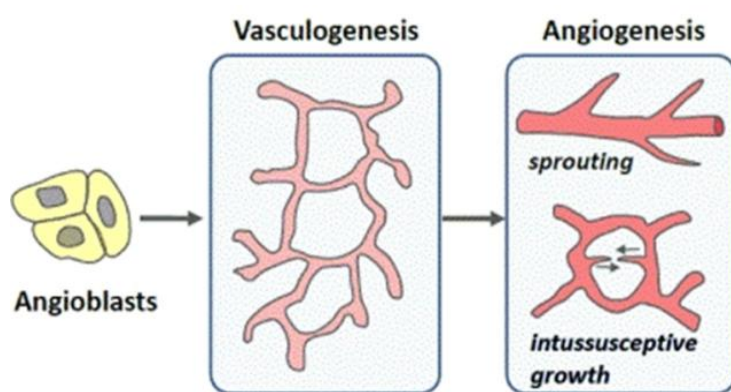
Figur 2.9: Eksempel på forbindelser som er tubulinhemmere.

2.5 Angiogenese

2.5.1 Innledning

Alle cellene i kroppen har bestemte og forskjellige behov ut ifra hvilke funksjoner de skal utføre. De må ha tilgang til næring og oksygen for å skaffe seg energi og materialer for vekst og reparasjon. Disse prosessene genererer mange metabolske avfallsstoffer og karbondioksid som må elimineres. Derfor er det vaskulære nettverket bygget slik at hver celle i kroppen har en avstanden på 50-100 mikrometer fra blodkarene. Denne avstanden sørger for en optimal diffusjon av oksygen og makromolekyler mellom det vaskulære nettverket og kroppens celler og vev. Om denne avstanden økes, vil det utvikles hypoksi i områdene lengst vekk fra blodkarene, og uten oksygen og næring vil cellene sulte. Hjerterinfarkt er et eksempel på hva som kan skje når cellene ikke får næring eller oksygen. En av blodårene som gir oksygen til hjertemusklene blir blokkert, og dette resulterer i død av muskelfibrer, og hvis den ikke behandles raskt kan pasienten dø.

Dannelsen av blodkar under utviklingen av et embryo kan deles inn i to trinn: **vaskulogenese** og **angiogenese**. Vaskulogenese er en embryonal prosess med nydanning av blodkar og etablering av et blodomløp fra primitive endotelceller, kalt for angioblaster. Angiogenese mener man derimot tilvekst av nye blodkar via stimulering av endotelceller fra allerede eksisterende blodkar^[25].

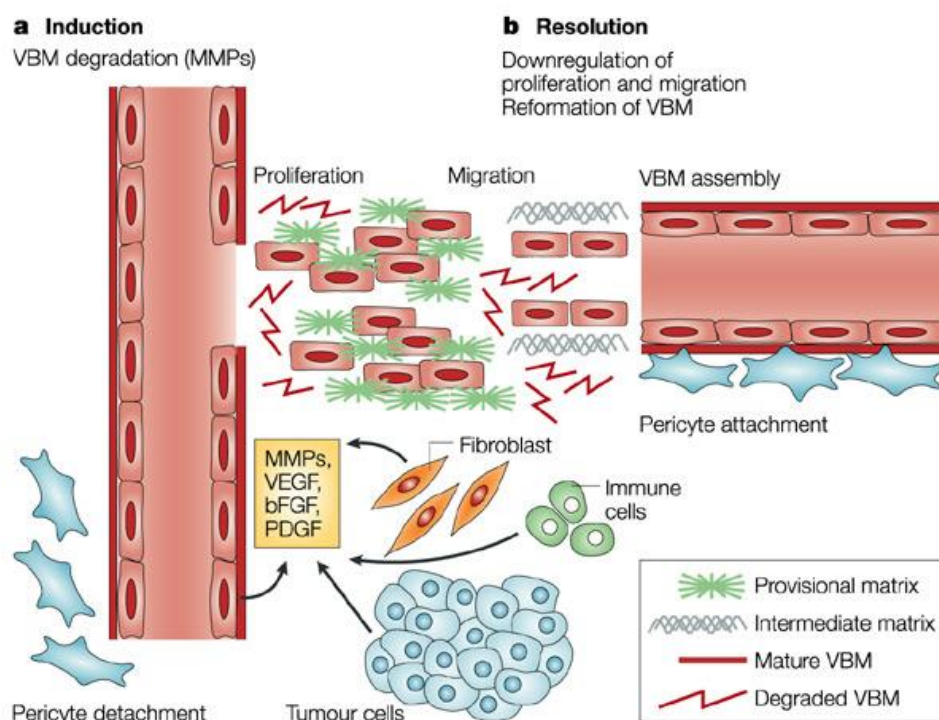


Figur 2.10: Skisse av vaskulogenese og angiogenese^[26]

Når en celle har behov for oksygen og næring, vil den skylle ut angiogenetiske faktorer, som for eksempel VEGF. Det finnes også andre angiogenetiske faktorer, og dette inkluderer bFGF og PDGF. Derimot er det VEGF som spiller en nøkkelrolle i denne prosessen. Denne vekstfaktoren vil blant annet binde seg til reseptoren som finnes på plasmamembranen av

endotelceller. Denne bindingen vil aktivere endotelceller i å produsere matriks metalloproteinase (MMP). Dette er enzymer som vil bryte ned ekstracellulære matrikse (ECM) som omgir blodårene, slik at endotelcellene kan invadere ECM og proliferere. Endotelcellene differensierer seg og danne nytt blodkar.

Dannelsen av blodkarene vil være avhengig av angiogenetiske faktorer. Produksjonen av VEGF er regulert av transkripsjonsfaktoren **HIF-1 α** (Hypoksi induisert faktor-1 α). Ved hypoksi vil denne transkripsjonsfaktorene aktiveres, og det vil føre til økt produksjon av VEGF som vil starte angiogenese prosessen.



Figur 2.11: Ved angiogenese vil ekstracellulære membrane brytes ned av MMP enzymet. Dette enzymet blir produsert av aktiverte endotelceller. Endotelceller vil så proliferere og differensieres slik at nytt blodkar blir dannet^[27].

2.5.2 Antiangiogenetisk behandling

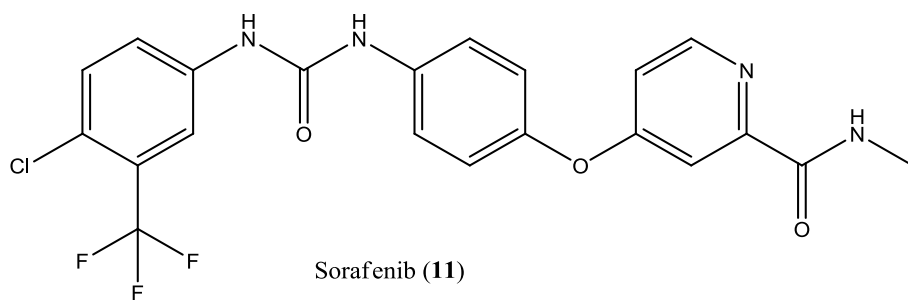
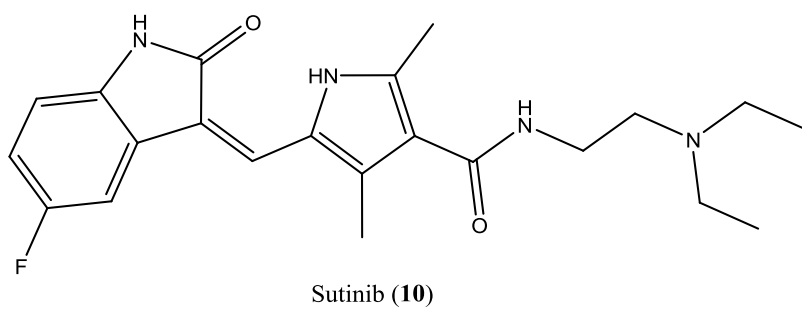
Tidlig på 1970-tallet postulerte Judah Folkman ved Harvard University om at angiogenesemodulerende medikamenter kunne være en effektiv strategi i behandlingen av kreft^[28]. De siste 15 årene har det vært en eksploderende interesse av feltet, som har generert en økende innsikt. Forskere har avdekket flere regulatorer av angiogenesen, og noen av disse representerer terapeutiske mål.

Kreftceller fremmer angiogenese ved å skille ut vekstfaktorer, som VEGF. Denne vekstfaktoren virker på endotelceller i blodkarene, og dette vil stimulere dem til å spre seg og utvikle seg til nye blodkar. Akkurat som det er faktorer som stimulerer angiogenese prosessen, er det også hemmere. I kroppen finnes det naturlige hemmere, slik som endostatin og thrombospondin. På grunnlag av dette har det blitt utviklet angiogenetiske hemmere av farmasøytiske selskaper. Disse inkluderer antistoffer og syntetiske forbindelser rettet mot blant annet vekstfaktorer, og vekstfaktor reseptorer. Prekliniske studier på mus og rotter antydte at angiogenetiske hemmere kan være effektiv i å stoppe tumor vekst.

Kjemoterapi angriper kreftceller og andre prolifererende celler, mens angiogenetiske hemmere kan angripe delende endotelceller mer selektivt. Av den grunn er det mindre fare for at slike forbindelser vil føre med seg bivirkninger som gastrointestinale symptomer og beinmargssuppresjon, som er karakteristisk for kjemoterapi. Det kreves mindre doser cytostatika for å påvirke endotelceller enn tumorceller. Endotelcellene i maligne svulster har høyere proliferasjonsrate enn i de fleste typer normalt vev, og dermed blir antiangiogenetiske behandlinger relativt tumorselektivt. I tillegg vil endotelceller i mindre grad enn tumorceller utvikle kjemoresistens, siden angrepspunktet ikke er den genetisk ustabile kreftcellen, men den genetisk stabile endotelcellen^[29].

Hemming av angiogenese i humane svulster er ikke like lett å få til, som det kunne ha vært forventet, basert på studier med mus. Hittil har de mest lovende resultatene vært oppnådd med det humane antistoffet bevacizumab (Avastin™) som blokker en VEGF-binding og aktivisering av dens reseptor, VEGFR. Dette antistoffet ble godkjent av FDA, hvor godkjenningen var basert på kliniske studier som viste at bevacizumab, i kombinasjon med standard kjemoterapi, kan forlenge livet til pasienter med metastatisk kolorektalcancer i flere måneder. Selv om dette langt fra representerer en kur, er dette en signifikant bedring hos pasienter med hovedsakelig avansert kolorektal kreft, men også lungekreftpasienter hadde effekt av legemidlet.

To andre antioangiogenetiske forbindelser sutinib (Sutent™) (**10**) og sorafenib (Nexavar™) (**11**), som er kinasehemmere, har siden blitt godkjent for behandling av bestemte typer avansert kreft, men ingen av disse midlene har en stor innvirkning på sykdomsforløpet og deres virkningsmekanisme er ukjent^[19].



Figur 2.12: Forbindelser med antiangiogenetisk effekt

3 2-Metoksiøstradiol

3.1 Innledning

2ME ble tidligere betraktet som en inaktiv metabolitt av østradiol, men er nå kjent for å være en antiangiogenetisk forbindelse med anti-proliferativ og cytotoxisk aktivitet, som gir anticanceraktivitet i enkelte dyremodeller av fast tumor. Derfor vil 2ME virke ved å anripe selve tumorcellen og tumorens blodtilførsel^[30, 31]. Denne forbindelsen vil dermed være et potensielt og nytt anticancerlegemiddel.

2ME besitter også kardioprotektiv aktivitet ved å hemme veksten av vaskulære glatt muskelceller i arteriene. Den har også en lav affinitet til østrogenreseptorene α og β , og har dermed minimal østrogen aktivitet^[7].

3.2 Farmakologiske egenskaper av 2ME

2ME utøver sin antitumor aktivitet gjennom tre måter^[31]: 1) reduserer angiogenesen, 2) hemmer cellulære proliferasjonen, 3) induserer programmert celledød i tumorceller.

3.2.1 2ME og antiangiogenetisk effekt

HIF-1 α er en transkripsjonsfaktor som er involvert i angiogenese, og aktiviteten av denne transkripsjonsfaktoren er hemmet av 2ME. Dette proteinet er overuttrykt i omtrent 70 % av alle krefttilfeller, og er dermed et interessant terapeutisk mål i kreftbekjempelsen. Økt aktivitet av HIF-1 α vil føre til økt utskillelse av den potente angiogenetiske faktoren VEGF, som igjen vil fremme angiogenetiske prosessen. Det ble rapportert at 2ME hemmer uttrykket, opphopning av proteinet i kjernen og transkripsjonsaktiviteten av HIF-1 α . Utskillelsen av VEGF blir dermed hemmet^[31-33].

3.2.2 2ME og tubulinhemmende effekt

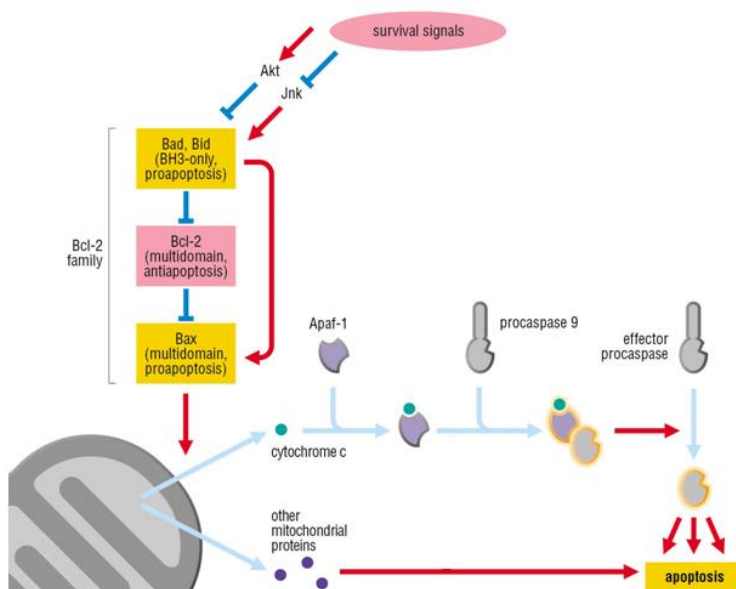
Legemidler som hemmer celleproliferasjonen ved å hemme dannelsen av mitotiske spindelen, har stadig blitt mer verdifull i behandling av ulike former for kreft. Mikrotubuli er strukturen som utgjør en del av cellulære skjelettet og er involvert i celledelingen. Tubulinhemmere er en vanlig klasse anticancerlegemidler som virker ved å forstyrre dynamikken av mitotiske spindlene. De vil enten hemme polymeriseringen eller fremme depolymeriseringen. 2ME har

denne tubulinhemmende effekten og fører til mitotisk arrestasjon i G₂/M overgangen, som senere vil føre til apoptose. Det har blitt rapportert at 2ME hemmer hastigheten, og ikke graden av polymeriseringen og depolymeriseringen av tubulin. Det er antatt at denne cytotoxiske aktiviteten er mediert ved at 2ME binder seg til tubulin, via kolkisins bindingssetet^[7, 31].

3.2.3 2ME og induksjon av apoptose

Den interne signalveien er blant annet regulert av proteiner kjent som Bcl-2 og Bcl-xl. Disse to proteinene har antiapoptotisk aktivitet, men når disse proteinene blir fosforylert blir denne aktiviteten hemmet. Det er kjent at tubulinhemmende legemidler fosforylerer Bcl-2 og Bcl-XL, og vil dermed indusere apoptose. Det har blitt rapportert at 2ME deler denne egenskapen. Blant annet vil 2ME forårsake fosforylering av Bcl-xl på serin 62, som er en effekt den deler med paklitaxel. Paklitaxel tilhører gruppen taxaner og er et potent tubulinhemmende legemiddel. 2ME har dermed evnen til å aktivere den interne signalveien.

Det har blitt rapportert at 2ME induserer fosforylering av BCL-2 ved å aktivere JNK (c-Jun-N-terminal kinase), som er en proteinkinase. I myeloma celler vil 2ME starte JNK aktiveringen som videre vil transporteres til mitokondria, og vil her redusere mitokondrienes membran potensial. Dette vil resultere i frigjøring av blant annet cytokrom C, som er en viktig komponent i apoptose. Dette vil resultere i celledød.



Hemming av JNK aktiveringen vil redusere 2ME-indusert apoptose. JNK spiller dermed en viktig rolle i denne interne

signalveien, men det viste seg at apoptosen ble ikke blokkert ved hemming av denne signalveien. Dette tydet på at 2ME kan initiere en annen signalvei, nemlig eksterne signalveien. 2ME vil i tillegg til aktivering av JNK, oppregulere dødsreseptoren DR5 på celleoverflaten. Dette vil øke nivået av caspase enzymene, som spiller en viktig rolle i

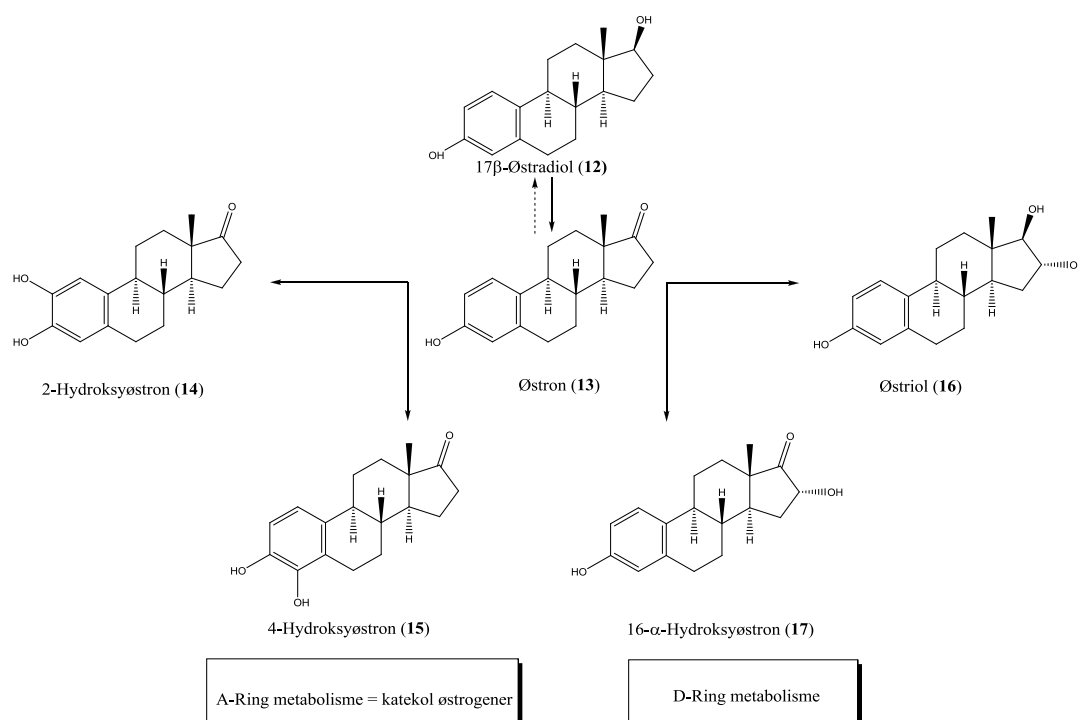
Figur 3.1: Aktivering av interne apoptotiske signalveien starter med frisetting av cytokrom C fra mitokondriene, som vil trigge aktivering av caspase kaskade som vil føre til apoptose. Frisettingen av cytokrom C er kontrollert av Bcl-2 proteinfamilien. 2ME vil aktivere JNK som videre vil fosforylere Bcl-2 proteinet. Dette vil hemme aktiviteten av dette proteinet^[15].

apoptosen. 2ME kan dermed aktivere både den interne og den eksterne apoptotiske signalveien^[31, 34].

3.3 Metabolisme

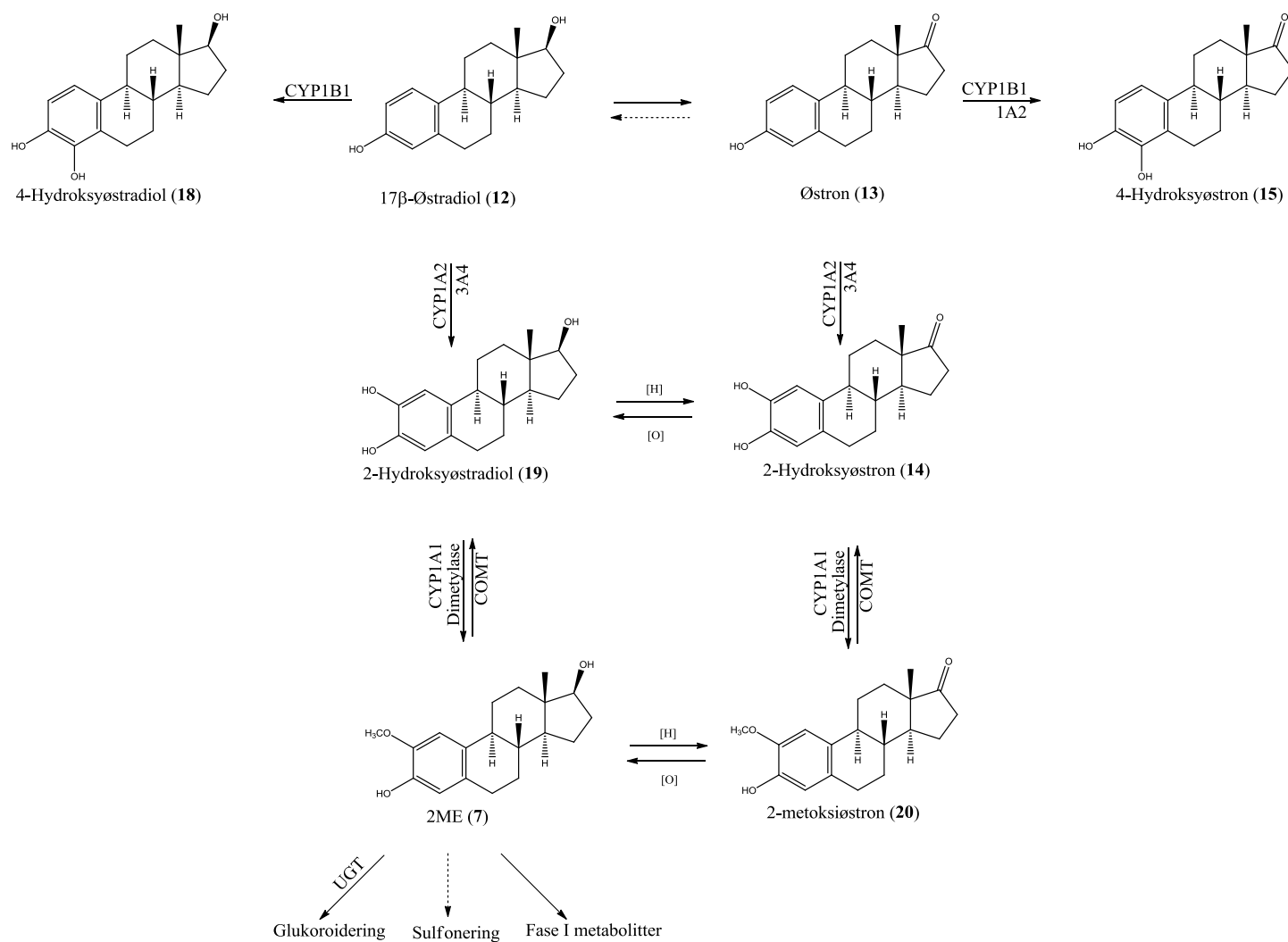
Metabolismen av østradiol hos både menn og kvinner, gjennomgår hovedsakelig oksidative prosesser. Hovedmetabolisme veien innebærer omdannelsen av østradiol (**12**) til østron (**13**) ved oksidasjon i C17 posisjonen, en prosess som er reversibel. Denne prosessen er generelt i favør av østron, hvor oksidasjonen av østradiol til østron skjer raskt, mens reduksjonen av østron til østradiol skjer mye saktere.

Fra østron fortsetter metabolismen på to forskjellige måter, nemlig ved hydroksylering av A-ringen på den ene siden og D-ring på den andre. Produktene i de to metabolske veier er dannet av to separate cytokrom P450 systemer. Når de er dannet, kan de ikke lenger reduseres tilbake til østron. De viktigste metabolittene som blir dannet av metabolismen i A-ringen er katekol østrogenene 2-hydroksyøstron (**14**) og 4-hydroksyøstron (**15**). Metabolismen av D-ringen er østriol (**16**) og 16 α -hydroksyøstron (**17**). De fleste østrogen metabolittene gjennomgår et ekstra degraderingstrinn av konjugering, enten ved glukuronidering, sulfonering, eller metylering.



Figur 3.2: Metabolisme av østradiol

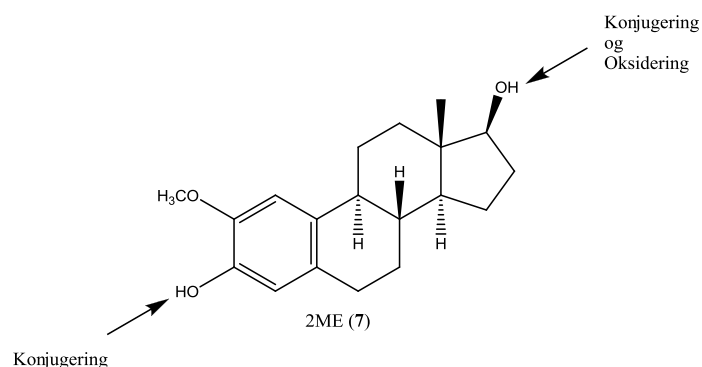
Østradiol og østron er substrater for fase I enzymene, CYP1A1 og 3A4. Disse enzymene spiller en viktig rolle i dannelsen av 2ME. Oksidativ metabolisme ved disse enzymene fører til dannelsen av 2-hydroksyøstradiol (**19**) og 2-hydroksyøstron (**14**). De to metabolittene kan så gjennomgå O-metylering av enzymet COMT. Dette vil resultere i dannelsen av 2ME (**7**) og 2-metoksiøstron (**20**). Forbindelse **20** kan også bli omdannet til 2ME.



Figur 3.3: Skisse over dannelsen og metabolisme av 2ME

3.4 SAR studier av 2ME

En rekke studier har rapportert SAR av 2ME med tanke på å øke den antiproliferative aktiviteten av forbindelsen. Problemet hos disse analogene har vært metabolismen og dermed dårlig biotilgjengelighet, og samtidig har de korte halveringstiden (mindre enn 0,5 timer). Det er to hovedmetabolske veier som fører til deaktivering og utskillelse av 2ME. Den første veien er oksidasjon av 17- β -hydroksysteroid dehydrogenase av 17-hydroksylgruppen og dermed omdanningen til 2-metoksi-østron. Den andre veien skjer ved konjugering på 3-posisjon eller 17-posisjon med sulfat eller glukuronsyre.



Figur 3.4: 2ME og potensielle metabolske veier^[30].

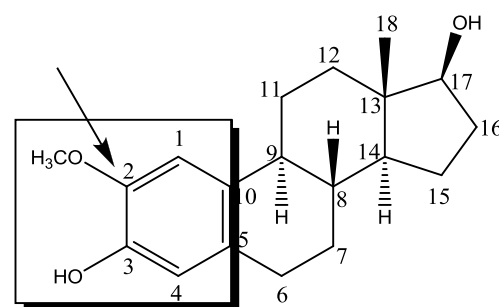
Nye 2ME analoger har blitt utviklet for å forbedre effektiviteten og den farmakokinetiske profilen av denne stoff klassen ved å modifisere 2, 3 og 17-posisjonene. Analogene med modifikasjoner på 3- og 17-posisjon har vist bedre metabolsk stabilitet og biotilgjengelighet som er forbundet med forbedret antitumor aktivitet^[30, 35].

Siden 2ME er et nytt potensielt anticancerlegemiddel, så har det blitt gjennomført en rekke SAR-studier på de forskjellige ringene. Under er de viktigste oppsummert:

3.4.1 SAR-studier på A-ring

2-posisjon:

Den optimale substituenten i 2-posisjonen for hemming av tubulin polymerisering, synes å være en uforgreinet kjede som består av tre atomer fra andre periode i periodesystemet (eks. C, N, O). Den biologiske aktiviteten faller når



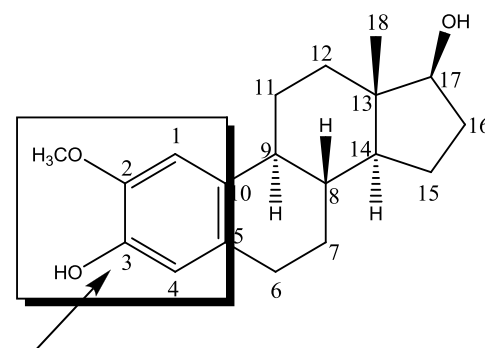
Figur 3.5: SAR av 2-posisjon

kjedelengden enten blir kortere eller lengre enn tre atomer. Det ble i en studie oppdaget at østradiol derivaten med etoksigruppen ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), etylamin ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$) og prop-1-en ($-\text{CHCHCH}_3$) på 2-posisjon var de to mest potentene, men hvor etoksigruppen var den optimale substituenten. Samtidig ble det oppdaget at etyltio-substituent ($-\text{SCH}_2\text{CH}_3$) førte til lavere aktivitet. Dette kan gjenspeile den store størrelsen på svovel siden den tilhører i den tredje perioden i periodesystemet. Dette kan indikere at størrelsen på substituent-gruppen 2-posisjon spiller en viktig rolle når det gjelder den biologiske aktiviteten. Svovelatomet hydrogenbindingsdonerende egenskap er lavere enn oksygenatomet, og dette kan også ha en betydning for biologiske aktiviteten^[36].

Det ble også oppdaget at isomer substituentene etoksi- og metoksimetyl ($-\text{CH}_2\text{OCH}_3$) gruppene viste forskjellige biologiske aktivitet, hvor den sistnevnte hadde lavere aktivitet. Samtidig ble det sett at substituenten perfluoretyl ($-\text{CF}_2\text{CF}_3$) hadde ingen aktivitet. Dette betyr at for å kunne opprettholde eller forbedre aktiviteten, må substituentene også bidra til elektrontettheten eller i det minste ikke trekke elektrontettheten vekk fra den aromatiske ringen. De frie elektronene i oksygenet i etoksi-gruppen bidrar til elektrontettheten, men det metoksimetyl-gruppen vil ikke bidra like mye som etoksigruppen.^[29]

3-posisjon:

I en SAR-studie av analoger modifisert i 3-posisjonen, ble det oppdaget at de mest aktive forbindelsene hadde hydrogen donerende egenskaper i denne posisjonen. Dette inkluderte aminonitril ($-\text{NHCN}$), urea ($-\text{NH}(\text{CO})\text{NH}_2$), formamid ($-\text{NH}(\text{CO})\text{H}$), amin ($-\text{NH}_2$), karboksamid ($-(\text{CO})\text{NH}_2$) og acetamid ($-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3$).



Figur 3.6: SAR av 3-posisjon

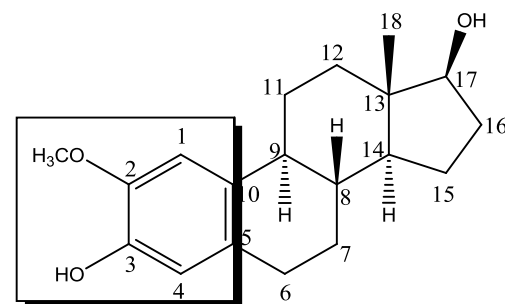
Evnen til å kunne donere hydrogen synes å være kritisk for den antiproliferative aktiviteten. For eksempel førte en isosterisk substitusjon av hydroksylgruppen i 2ME med tiol, til betydelig tap av aktiviteten. Dette kan forklares med at tioler har redusert evne til å donere hydrogen sammenlignet med hydroksylgruppen. Alkylering av et av amin eller hydroksylgrupper vil også redusere hydrogenondorevnen, og dette vil redusere anticanceraktiviteten.

Selv om muligheten til å donere et proton er viktig, er det også andre faktorer som bestemmer den antiproliferative aktiviteten for disse analogene. For eksempel vil de fleste av de beste

analogene inneholde π elektroner, enten som en del av karbonyl eller nitril. Størrelsen av 3-substituentene er også viktig, For 3-halogen forbindelser er 3-fluoro-analogen mer potent enn bromo- og kloro-analogene, hvor de sistnevnte har omtrent samme potens^[37].

A-ringen:

Det har blitt foreslått at antiangiogenetiske aktiviteten av 2ME er mediert gjennom interaksjonen på kolkisinsbindingssetet på tubulin. Et forsøk på å undersøke bindingen på kolkisin bindingssetet og forholdet mellom 2ME og kolkisin (**5**), førte til syntese av en rekke kolkisin/2ME hybrider. Disse A-



Figur 3.7: SAR av A-ringen

homoestran hybridssystemer er kalt for estratroponer. Dette betyr at A-ringen er en konjugert syvring med en ketogruppe enten på C-2, C-3, eller C-4 i steroidstrukturen (se figur 3,8). De fleste av disse hybrider hemmer polymeriseringen av tubulin med større potens enn kolkisin og 2ME. Den mest potente forbindelsen hadde tilnærmet 5 ganger økt aktivitet i forhold til kolkisin. Substituentene på troponringen viste varierende aktiviteter for de to klassene av estratroponer som ble studert, C-3 okso- (**21**) og C-4 oksoforbindelsene (**22**). 3-Substituerte 4-oksoestratroponer viste

antitubulin-aktivitet i henhold til

$\text{Cl} \approx \text{Br} > \text{OCH}_3$, mens 4-

substituerte 3-oksoestratroponer

viste aktivitet i henhold til

$\text{OCH}_3 > \text{Br} \approx \text{Cl}$. Det betyr at

analoger med ketogruppen i C4,

vil elektrondonerende α -

substituenten på C3 redusere

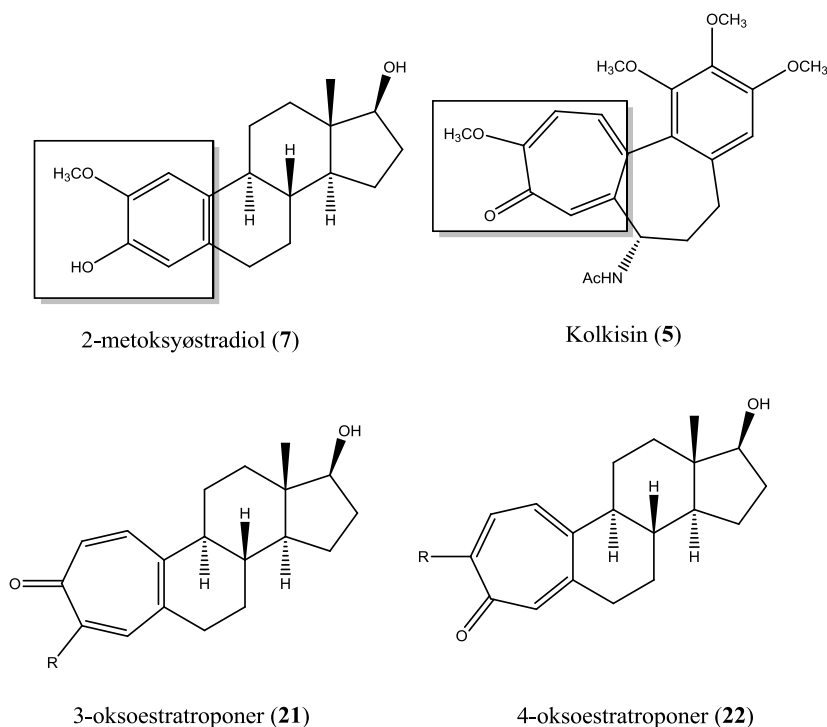
aktiviteten, mens analoger med

ketogruppen i C3, vil

elektrontiltrekkende α -

substituenten på C4 redusere

aktiviteten^[38].

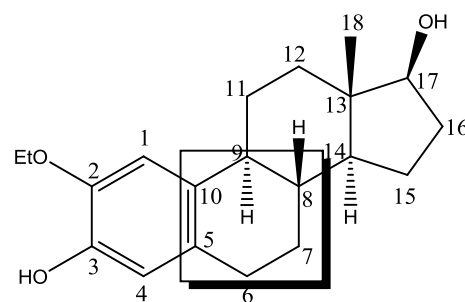


Figur 3.8: Estratroponer analogene av 2ME^[38]

3.4.2 SAR-studier av B-ring

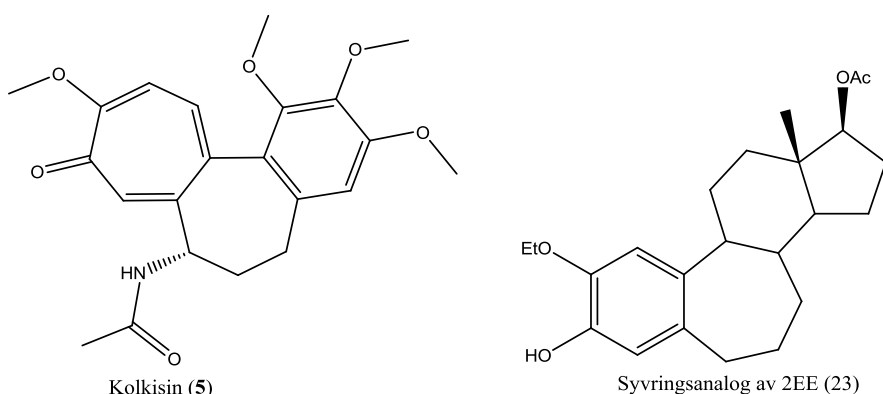
B-ringen:

En av de mest aktive analogene som har blitt laget, er 2-etoksiøstradiol (2EE). Det har blitt gjort modifikasjoner av B-ringen av 2EE, og dette førte til dannelse av to forbindelser med forskjellige effekter.



Figur 3.9: SAR av B-ringen

Utvidelsen av B-ringen til en syvring, resulterte i en forbindelse med lik aktivitet som 2EE, med tanke på hemming av polymerisering av tubulin og bindingen av kolkisin bindingssetet. Acetylering av hydroksylgruppene i C-3 og C-17 i denne analogen, førte til tap av aktivitet. Ved å introdusere en ketogruppe på C-6 på den acetylte syvring-analogen, resulterte i forbindelse (**23**), som hadde samme aktivitet som paklitaxel. Det ble så videre oppdaget at acetylgruppen på C-17, men ikke på C-3, var avgjørende for denne paklitaxel-lignende aktiviteten^[39].

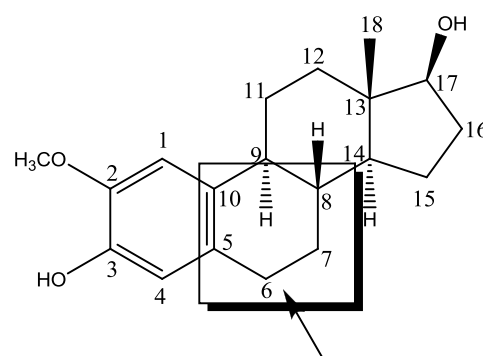


Figur 3.10: B-ringen i 2EE analog ble ekspandert til syvring for å etterlikne kolkisin (5)

Det har også blitt utført aromatisering av B-ringen, og dette resulterte i en forbindelse med redusert cytotoxisk aktivitet og ingen tubulinhemmende effekt^[40].

6-posisjon:

De modifikasjonene som har blitt utført i denne posisjonen, inkluderer analoger bestående av keto-, oksoimino (=NOH), metoksiimino (=NOCH₃), hydrazono (=NNH₂), amino og hydroksyl-grupper. De fleste analogene førte til

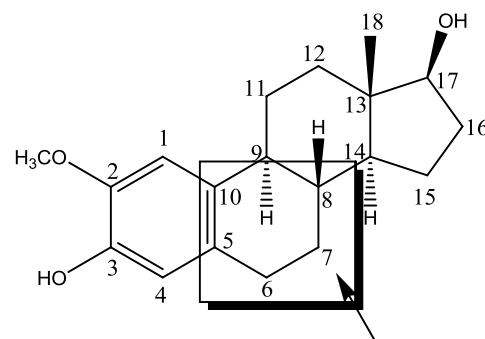


Figur 3.11: SAR av 6-posisjon

reduisert cytotoxisk aktivitet av ulik grad, men 6-oksoimino-derivatet viste større aktiviteten enn den opprinnelige forbindelsen. Innføringen av en dobbeltbinding i 6-posisjon (C6-C7) i 2-etoksianalogen førte til reduksjon av aktiviteten med en faktor på 90^[40, 41].

Posisjon 7:

Innføringen av en dobbeltbinding ved 7-posisjon til 7-dehydro-2ME (C7-C8), viste mindre eller lik cytotoxisk aktivitet som 2ME. Det ble også rapportert at en α -metylgruppe ved denne posisjonen, reduserte den cytotoxiske og tubulinhemmende aktiviteten^[40, 42].

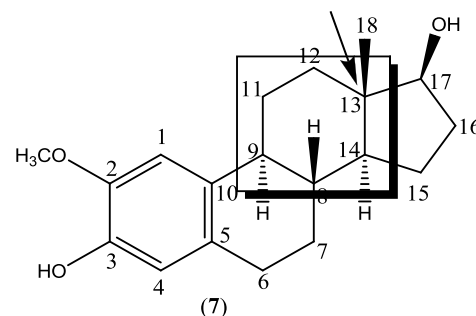


Figur 3.12: SAR av 7-posisjon

3.4.3 SAR-studier av C-ringen

13-posisjon:

2ME har en metylgruppe på 13-posisjon som er plassert ved siden av den 17-hydroksylgruppen. Det ble gjort et forsøk ved å erstatte metylgruppen med en mer sterisk hindret etylgruppe. Dette kunne dermed beskytte 17-hydroksylgruppen fra metabolsk deaktivering. Erstatning av metylgruppen med etylgruppen resulterte i en forbindelse med lik biologisk aktivitet^[43].



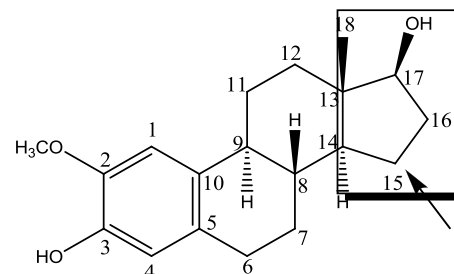
Figur 3.13: SAR av 13-posisjon

Det har også gjort et forsøk på å endre konfigurasjonen av metylgruppen, altså fra *S*- til *R*-konfigurasjon. Dette resulterte i reduksjon av den cytotoxiske aktiviteten^[40].

3.4.4 SAR-studier av D-ringen

15-posisjon:

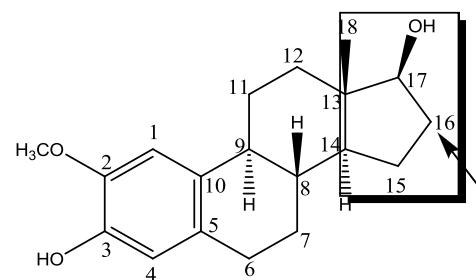
SAR-studiet ved C-15 indikerte at *cis*-substitusjon ved C-15 og C-16 resulterte i redusert cytotoxisk aktivitet og tubulinhemmende aktiviteten, hvor β -substituerte analoger er mindre aktive enn α ^[40].



Figur 3.14: SAR av 15-posisjon

16-posisjon:

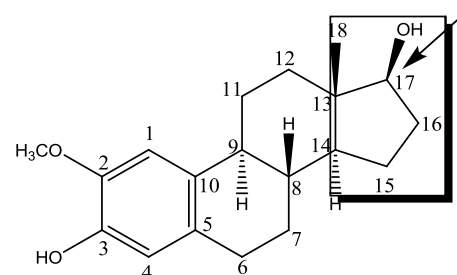
Det ble antatt at store grupper i 16-posisjonen ville øke den cytotoksiske aktiviteten. Derimot viste det seg at kun metyl- og etylgruppe ga tilnærmet samme aktivitet som 2ME, mens propyl, butyl eller *iso*-butyl reduserte den cytotoksiske aktiviteten^[44].



Figur 3.15: SAR av 16-posisjon

17-posisjon:

17-hydroksy analoger er mer aktiv enn 17-okso analoger. Dette støtter antagelsen for at 17-hydroksylgruppen er nødvendig for aktiviteten. Men et unntak er 2-metoksiøstron-3-O-sulfamat, hvor denne forbindelsen var 10 ganger mer aktiv enn 2ME mot humane brystkreft celler^[40, 43].



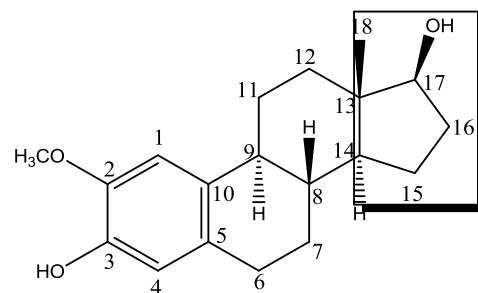
Figur 3.16: SAR av 17-posisjon

2ME er ofte metabolisert ved at 17-hydroksyl gruppen blir oksidert til en ketogruppe, slik at det blir dannet 2-metoksiøstron. Det har gjort blitt studier hvor det har blitt laget analoger som vil blokkere denne oksidasjonen. Det viste seg at kun 17-metylen, 17-etylen og 16,17-olefin hadde bedre antiproliferativ aktivitet enn 2ME. En økning av karbonkjedelengden i C-17 ga en moderat til betydelig reduksjon i antiproliferativ aktivitet. På samme måte som substitusjonen på C-16, så tolereres ikke store grupper i C-17.

Aktiviteten ble også redusert ved acetylering av hydroksylgruppen. Introduksjon av ikke-sure polare grupper på 17-posisjon, som amin, hydroksylamin (=NOH) og karboksiamin (-(CO)NH₂), ga ingen endring i den antiproliferative aktiviteten i forhold til 2ME. Derimot ville dannelsen av en karboksylsyre i denne posisjonen føre til at aktiviteten ble borte. Dette betyr at sure grupper ikke er tolerert ved denne posisjonen. Dette kan komme av at karboksylsyre gruppen hindrer forbindelsen å trengte inn i cellen på grunn av dårlig cellepermeabilitet^[45].

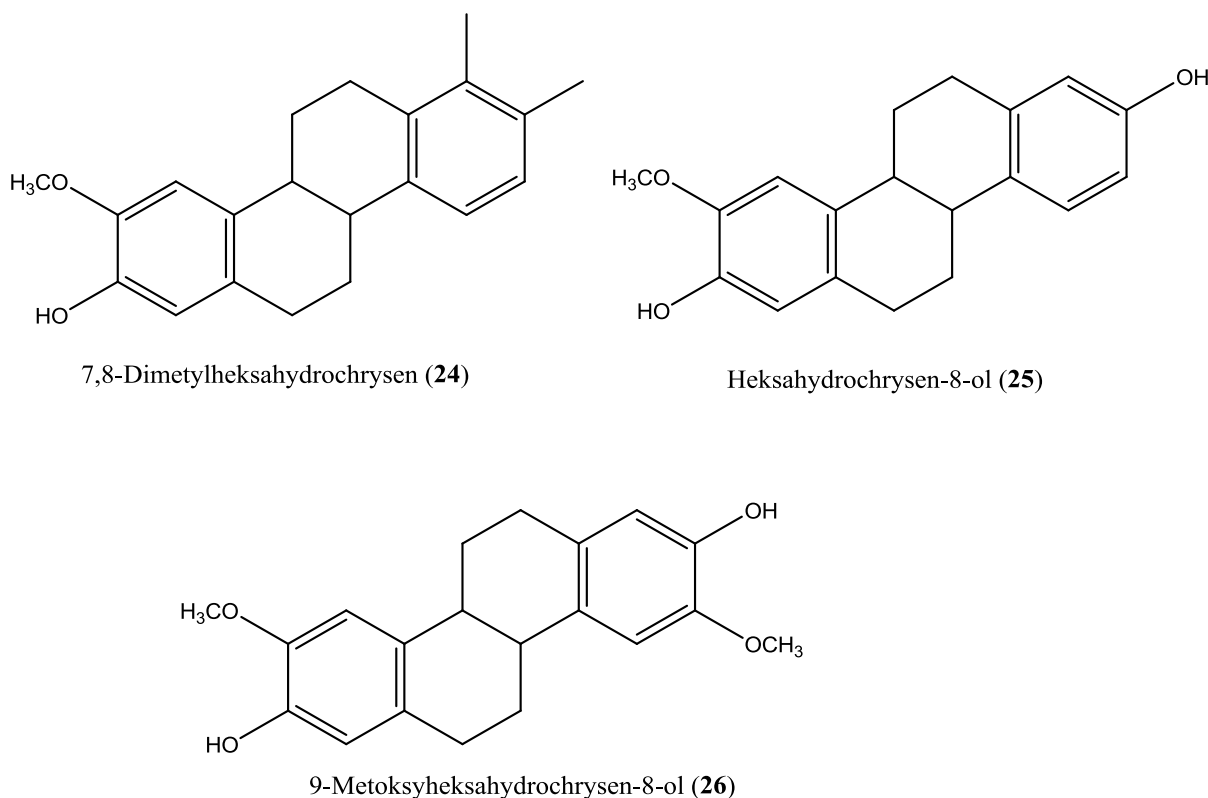
D-ringen:

Det har blitt laget to forbindelser med umettet D-ring, 14-dehydro-2ME og 15-dehydro-2ME. Disse to forbindelsene hadde en økt cytotoxisk aktivitet i forhold til 2ME, hvor 14-dehydro-2ME var den forbindelsen som var mest potent av de to^[42].



Figur 3.17: SAR av D-ringen

D-ringen har også blitt ekspandert fra en 5-ring til en 6-ring, og aromatisering av den ekspanderte 6-ringen, slik at det blir dannet en benzenring. Ekspanderingen til 6-ringen resulterte i total tap av den cytotoxiske aktiviteten, mens aromatisering varierte som følge av hvilken substitusjon ringen hadde. Tre forbindelser ble undersøkt, 7,8-dimetylheksahydrochrysen (**24**) analog, heksahydrochrysen-8-ol (**25**) og 9-metoksiheksahydrochrysen-8-ol (**26**). Det viste seg at de to første forbindelsene var mer potent enn 2ME, mens den siste forbindelsen hadde ingen aktivitet^[46].



Figur 3.18: Aromatisering av D-ringen av 2ME^[46].

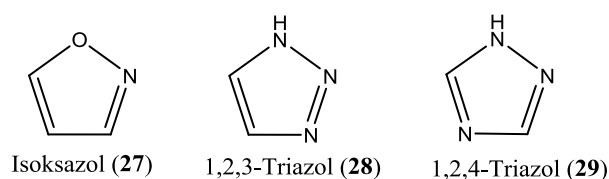
4 Isoksazoler og triazoler

4.1 Innledning

Aromatiske heterosykliske forbindelser spiller en viktig rolle i legemiddelkemi og legemiddelutvikling. Mer enn halvparten av alle kjente legemidler inneholder minst en heterosyklisk komponent i strukturen^[47].

Azoler er en gruppe forbindelser der molekylene består av femringer med minst ett nitrogenatom. I tillegg til nitrogenatomet kan ringen inneholde andre heteroatomer, for eksempel oksygen.

Isoksazoler (**27**) er aromatiske femringer som inneholder et oksygen- og et nitrogenatom hvor atomene ligger i en 1,2-posisjon. Triazoler er aromatiske femringer med 3 nitrogenatomer. Det finnes blant annet 1,2,3-triazoler (**28**) og 1,2,4-triazoler (**29**)^[48].



Figur 4.1: Struktur over isoksazol og 1,2,3-triazol

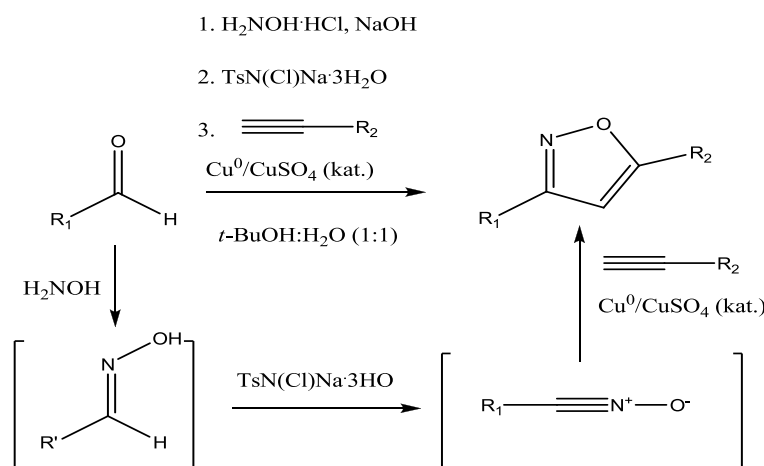
Isoksazoler og 1,2,3-triazoler har vist å ha interessante biologiske aktiviteter, og disse forbindelsene har dermed gjennom årene fått et økt fokus i legemiddelutviklingen.

4.2 3,5-disubstituert isoksazoler

Isoksazoler er potente selektive agonister på dopamin D₄-reseptorer og antagonister på GABA-reseptorer. Andre aktiviteter som denne forbindelsen viser, inkluderer smertestillende, betennelsesdempende, antimikrobiell, antifungal og anticancer aktivitet^[49]. Denne heterosykliske ringen har også fysiske og kjemiske egenskaper som gjør den nyttig i legemiddelkemi. Isoksazolringen er stabil mot sur og basisk hydrolyse, og reduktive betingelser. Videre er den bioisoster av pyridin eller karboksylsyre grupper, og er også involvert i peptidomimetika.

Disse egenskapene som isoksazoler har, er sterkt avhengig av substituenten på ringen. Isoksazoler med substituenten på 3- og 5-posisjon har vist seg å ha disse egenskapene og derfor svært nyttig i legemiddelutviklingen^[50]. Det har blitt utviklet en rekke syntesemetoder for dannelsen av 3,5-disubstituerte isoksazoler, men i denne oppgaven ble det benyttet en

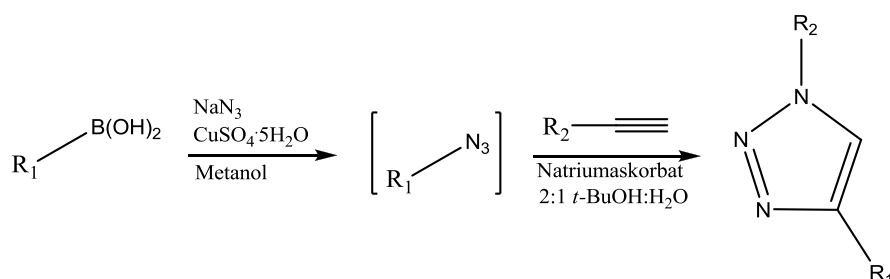
metode utviklet av Hansen *et.al*, som er en one-pot kobber(I) katalysert syntese av 3,5-disubstituerte isoksazoler^[51].



Skjema 4.1: Reaksjonsligning for kobber (I) katalysert syntese av 3,5-disubstituerte isoksazoler

4.3 1,4-disubstituert 1,2,3-triazoler

1,2,3-Triazoler har også mange biologiske aktiviteter, og dette inkluderer antibakteriell, antifungal, antiallergikum og anti-HIV aktivitet. Denne heterosykliske ringen har også fysikalske og kjemiske egenskaper som gjør den svært nyttig i legemiddelutviklingen. De er stabile mot sure og basiske hydrolyser, samt mot reduktive/oksidative forhold. N-2 og N-3 i ringen kan delta i dannelsen av hydrogenbindinger, dipol-dipol π -stacking interaksjoner. CuAAC som ble utviklet av professor K.B. Sharpless og hans medarbeidere har ført til økt interesse for klikk-kjemi. Dette blir nærmere forklart i kapittelet **5,2 Klikk-reaksjoner**. I denne oppgaven ble det benyttet en metode som ble utviklet av Tao og medarbeidere, som er en one-pot kobber(I) katalyser syntese for dannelsen 1,4-disubstituerte 1,2,3-triazoler^[52, 53].



Skjema 4.2: Reaksjonsligningen for kobber(I) katalysert syntese av 1,4-disubstituerte 1,2,3-triazoler

5 Syntesemetoder

Dette kapittelet er en generell beskrivelse over reaksjonsmetodene som ble benyttet for fremstillingen av 2ME analogene.

5.1 Oppenaueroksidasjon

5.1.1 Innledning

Som følge av stadig strengere miljømessige begrensninger, er det strengere krav for bruken av tradisjonelle oksidanter i industrielt skala, som for eksempel dikromat. Dermed har det blitt en vanlig å bruke katalytiske metoder som ikke genererer vandig flytende avfall som inneholder store mengder av uorganiske salter.

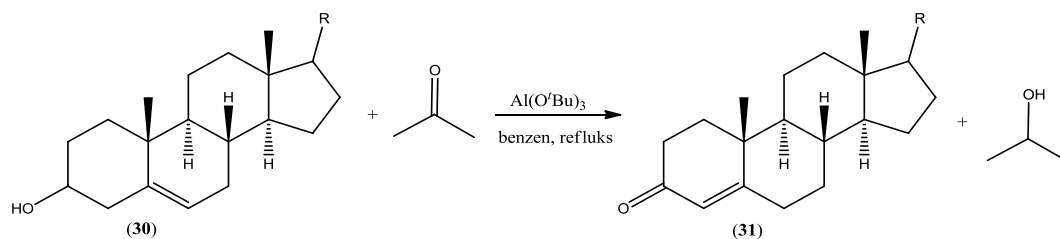
I de senere årene har det blitt lagt mer vekt på å utvikle mer effektive oksidasjonsmidler som har evnen til å oksidere alkoholer. Katalytiske metoder unngår bruk av støkiometriske uorganiske reagenser, og dette vil gi miljømessige gevinster. Videre kan de katalytiske prosessene redusere driftskostnadene ved at disse forbindelsene kan være kjemo-, regio- eller stereoselektive.

5.1.2 MPVO

Meerwein-Ponndorf-Verley reduksjoner av aldehyder og ketoner og Oppenauer oksidasjoner av alkoholer (MPVO) er eksempler på kjemoselektive reaksjoner som kan utføres under milde betingelser. Reduktantene eller oksidantene er enkle, billige organiske molekyler og MPVO reaksjoner er utført av lett tilgjengelige og regenererbare metallalkoksider.

Fordeler med Oppenaueroksidasjonen omfatter kjemoselektivitet (ingen over-oksidasjon til karboksylsyrer), enkel å utføre, sikker håndtering og kan tilpasses både på laboratoriet og i stor skala.

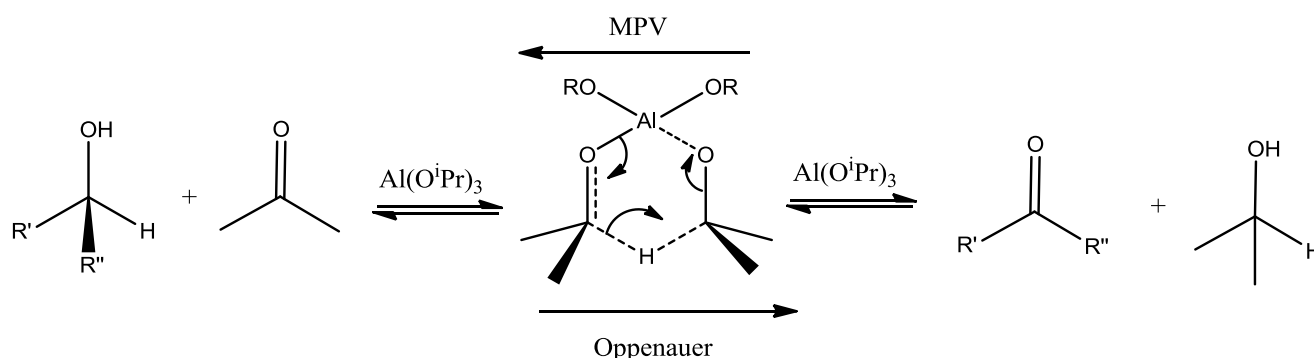
Den reversible reduksjonen av aldehyder og ketoner ble demonstrert av Verley i 1925, og kort tid etterpå ved Ponndorf^[54, 55], men det var ikke før 1937 at Oppenauer første gang påviste anvendeligheten i direkte oksidasjon av Δ^5 (6)-3-hydroksy steroidet (**31**) til Δ^4 -3- keton steroidet (**32**) ved hjelp av aluminium *tert*-butoksid og aceton i benzenløsning^[56].



Skjema 5.1: Dannelse av forbindelse **31** fra forbindelse **30** skjer ved oppenauer oksidasjon^[57].

Oppenauer oksidasjonen synes å være en god oksidasjonsmetode. Denne oksidasjonsmetoden gir høye utbytter og det blir brukt milde reaksjonsbetingelser. Denne reaksjonen har vist seg å være nyttig i syntesen av naturprodukter.

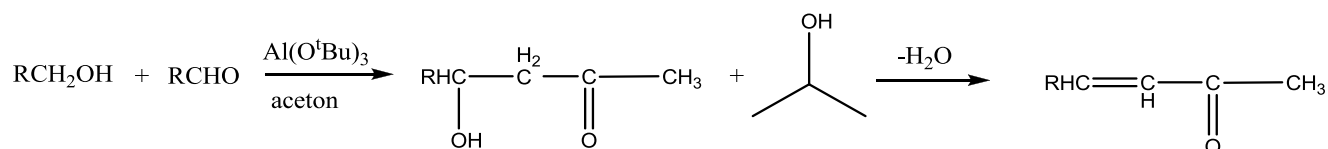
I MPVO-reaksjonen vil et hydrogenatom bli overført fra et organisk molekyl til et annet. Det har blitt foreslått at hydrogenoverføringen fra alkohol til et keton eller *vica versa*, skjer gjennom en seksrings overgangstilstand hvor både reduktanten og oksidanten er koordinert til metallalkoksidet.



Skjema 5.2: MPVO reaksjoner skjer via en seksrings overgangstilstand^[57].

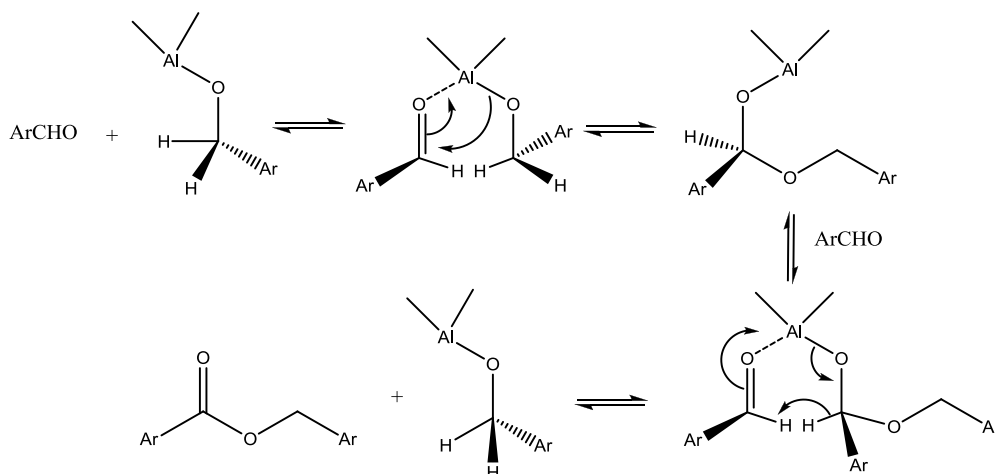
Selv om det i teorien krever bare katalytiske mengder av metallforbindelsen i Oppenauer oksidasjonen, så er det vanlig å utføre oksidasjonen ved støkiometrisk mengde av $\text{Al}(\text{O}^i\text{Pr})_3$ og overskudd av aceton, hvor de to spiller rollen som oksidasjonsmiddel og løsemiddel. I slike forhold produseres det store mengder av biprodukter og dannelse av uønskede salter under opparbeidelsen. En annen ulempe ved denne oksidasjonsmetoden er at det kan skje to uønskede reaksjoner, aldol kondensasjon og Tishchenko reaksjon.

Aldol kondensasjon skjer hovedsakelig når det blir dannet et aldehyd fra en primær alkohol, og under denne reaksjonen vil det bli dannet vann som vil deaktivere alkoksidet.



Skjema 5.3: Aldol kondensasjon forekommer under oksidasjon av primær alkohol^[57].

Når aldehydene mangler α -protoner, kan forbindelsene gjennomgå Tishchenko reaksjonen, hvor produktet vil være en ester forbindelse.



Skjema 5.4: Aldehyder som mangler α -hydrogen kan gjennomgå Tischenko reaksjon^[57].

Begge disse uønskede reaksjonene kan unngås ved å bruke milde reaksjonsbetingelser som å senke reaksjonstemperaturen og bruke sterkere oksidanter. Ved å bruke sterkere oksidanter vil det føre til raskere oksidasjon, og dette vil samtidig minke sannsynligheten for andre uønskede reaksjoner.

Aceton ble tidligere valgt som oksidant. Selv om aceton hadde en lav oksidasjonsevne, så ble den valgt siden den var billig og kan også bli brukt i store mengder. Samtidig er det lett å fjerne kondensasjonsproduktet mesityloksid. Sykloheksanon er nå førstevalget siden den har en høyere oksidasjonspotensiell enn aceton og høyere kokepunkt som kan redusere reaksjonstiden. Sykloheksanon er særlig nyttig i oksidasjon av steroider siden den kan separeres fra reaksjonsproduktet ved destillasjon^[57, 58].

5.2 Klikk-reaksjoner

5.2.1 Innledning

Den tradisjonelle prosessen av "drug discovery" som er basert på naturlige metabolitter, har ofte vært treg, kostbar og arbeidskrevende. Selv med bruk av kombinatorisk kjemi og high-throughput screening i de siste to tiårene, vil dannelsen av nye "lead compounds" være avhengig av påliteligheten til de enkelte syntetiske reaksjonene^[52].

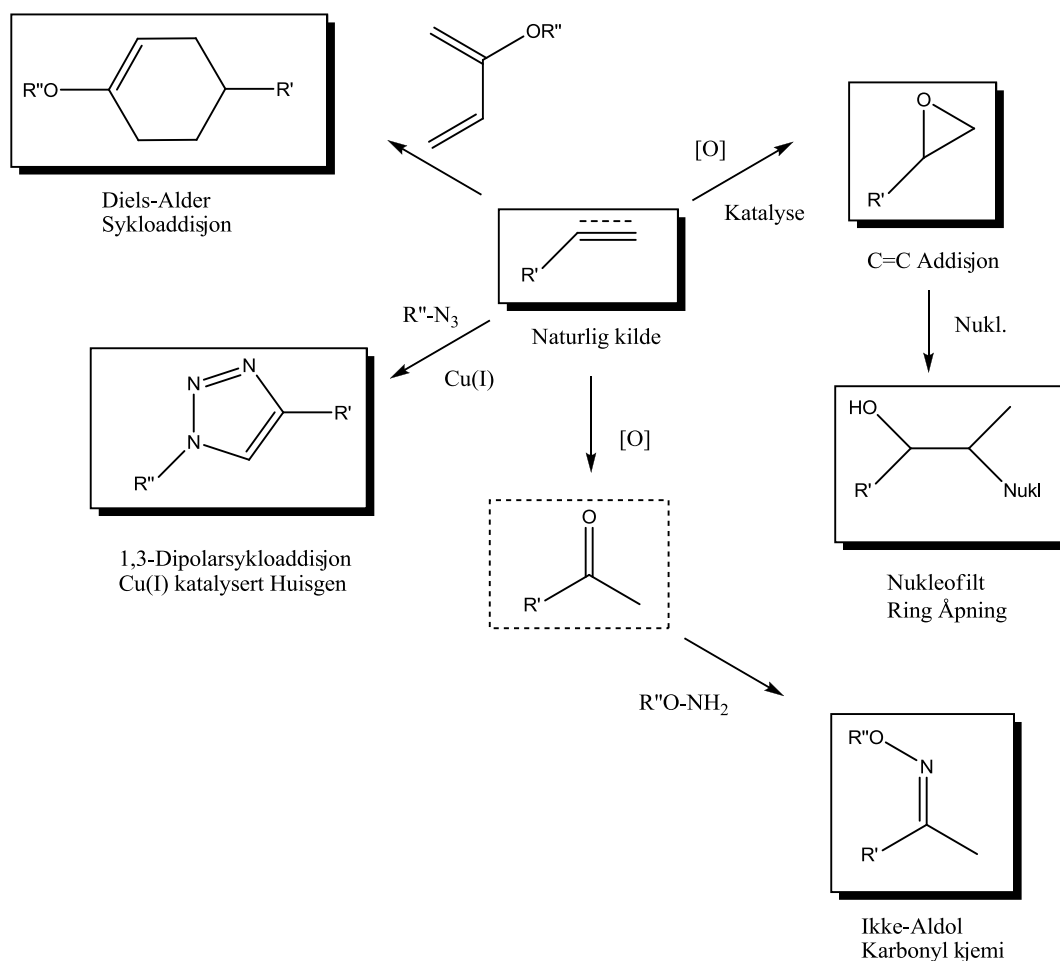
Klikk-kjemi er en ny tilnærming til syntese av legemiddel-lignende molekyler som muligens kan fremskynde "drug discovery" prosessen.

Klikk-kjemi er et begrep som ble introdusert av professor K.B. Sharpless i 2001 om reaksjoner som gir høy utbytte, skaper kun biprodukter som kan fjernes uten kromatografi, er stereospesifikke, enkelt å utføre, bruker kun tilgjengelige reagenser, ufølsom for oksygen og vann, og opparbeidelsen og rensingen bruker kun ikke-halogenerte løsemidler^[59].

Klikk-reaksjoner oppnår sine nødvendige egenskaper ved at de har en høy termodynamisk drivkraft. Dette vil resultere i at reaksjonen går raskere og er svært selektivt for en enkelt produkt dannelse.

Eksempel på reaksjoner som kan være definert som en klikk-reaksjon inkluderer:

- Sykloaddisjoner - dette refererer primært til 1,3-dipolarsykloaddisjoner, men også hetero Diels-Alder sykloaddisjon
- Nukleofil ring åpninger - dette referer til åpninger av heterosykliske elektrofiler med høy spenning som aziridiner, epoksider, sykliske sulfater, aziridinium ioner, episulfonium ioner, etc.
- Karbonylkjemi som ikke er av typen aldolkjemi - dette gjelder for eksempel dannelse av urea, tiourea, hydrazon, oksimeter, amider, aromatiske heterosykler, etc.
Karbonylreaksjoner av aldol typen har generelt lav termodynamisk drivkraft, og derfor har lengre reaksjonstid og gir uønskede produkter, og kan derfor ikke betraktes som klikk-reaksjon.
- Addisjonsreaksjoner til karbon-karbon dobbeltbindinger/ π -bindinger - dette gjelder for eksempel epoksidering, dihydroksyleringer, etc^[52, 59]



Figur 5.1: Reaksjoner som er definert som klikk-reaksjoner^[59].

5.2.2 Kobber(I) katalysert alkyn-azid sykloaddisjonsreaksjon (CuAAC)

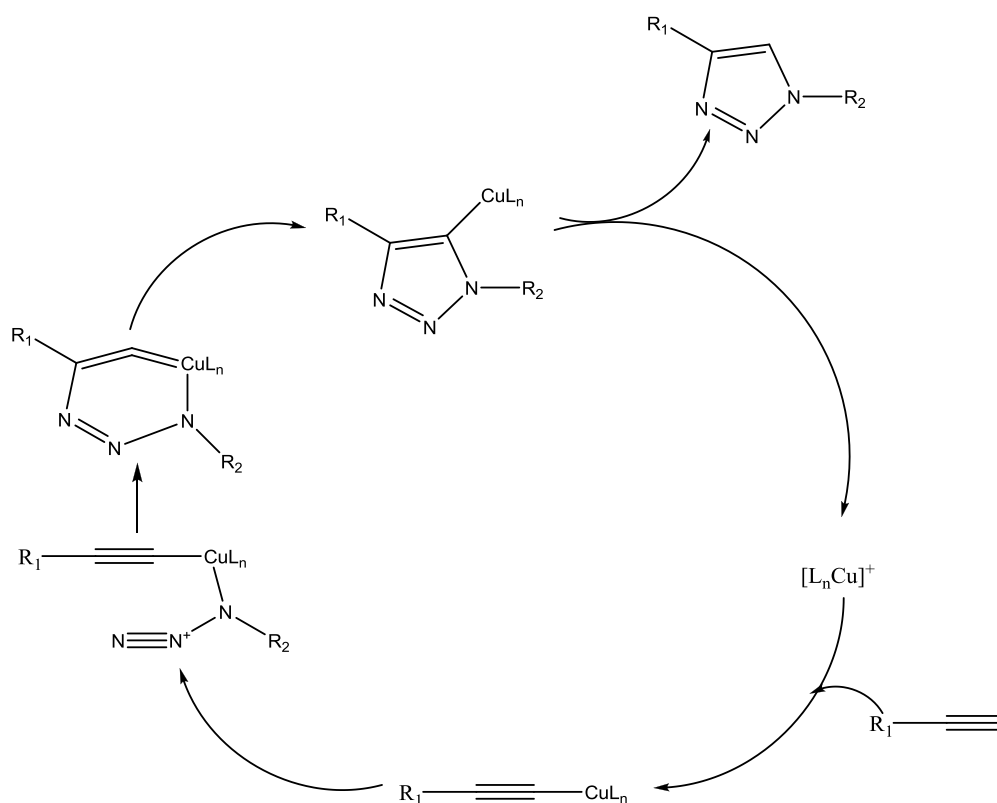
Av de reaksjonene som har oppnådd status som potensielle ”klikk-reaksjoner”, er det beste eksempelet Huisgen 1,3-dipolar sykloaddisjon av alkynes og azider i dannelsen av 1,2,3-triazoler. Dessverre krever denne klassiske Huisgen 1,3-dipolar sykloaddisjonen høy temperatur og produserer ofte blandinger av to regioisomerer, 1,4- og 1,5-disubstituerte forbindelser. I denne sammenhengen svikter den klassiske 1,3-dipolarsykloaddisjonen som en sann klikk-reaksjon. En kobber-katalysert variant, CuAAC, er rapportert å være regiospesifikt. Mens den klassiske Huisgen 1,3-dipolarsykloaddisjon gir ofte blandinger av regioisomerer, vil CuAAC danne utelukkende 1,4-substituerte produkter.

CuAAC krever vanligvis ikke høy temperatur, men kan utføres over et bredt spekter av temperaturer (0-160 °C), i en rekke løsemidler (inkludert vann), og over et bredt spekter av pH-verdier (5 til 12). Denne klikk-reaksjonen er 10^7 raskere enn den ukatalyserte versjonen, og rensingen består hovedsakelig av enkel filtrering. Videre er den upåvirket av steriske

faktorer. Forskjellige substituerte primære, sekundære, tertiære, og aromatiske azider kan delta i denne sykloaddisjonen. Toleransen for forskjellige alkyn komponenter er også utmerket. Alle disse egenskapene gjør at denne sykloaddisjonen er populær^[60].

To ekstra grunner til denne populariteten av CuAAC, skyldes at azider og terminale alkynes er ganske enkelt å fremstille, og de er stabile ved standard betingelser. Begge tåler oksygen, vann, og et stort utvalg av løsemidler og pH. Selv om nedbrytning av alifatisk azider er termodynamisk favorisert, eksisterer det en kinetisk barriere som tillater dem å være stabil i de nevnte forholdene^[61].

Det har blitt foreslått at mekanismen av CuAAC starter med π kompleksing av en Cu(I) dimer til alkynet. Dette vil senke pK_a til det terminal alkynet med så mye som 9,8 pH-enheter, og det gjør mulig for deprotonering av terminale hydrogenet, uten tilsetning av en base. Dette resulterer i dannelsen av Cu-acetylid. I neste trinn vil azidet reagere med Cu-acetylid og det blir dannet et kompleks som vil favorisere triazoldannelsen^[60].



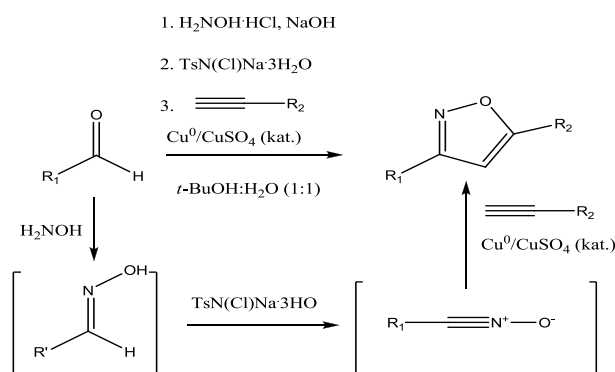
Figur 5.2: Foreslått reaksjonsmekanisme av CuAAC^[60].

5.2.3 One-pot kobber(I)-katalysert syntese av 3,5-disubstituerte isoksazoler

CuAAC gir som nevnt utelukkende 1,4-disubstitutert 1,2,3-triazoler og er et typisk eksempel på en klikk reaksjon. Denne *in situ* genererte Cu-acetylid er ikke bare begrenset til azider. Faktisk har nitroner, nitril oksider og azometin iminer vist seg å delta i lignende katalytiske transformasjoner^[51].

Selv om ukatalyserte 1,3-dipolare sykloaddisjonsreaksjoner av nitriloksider og acetylen er har vært kjent i lang tid, så har anvendelsen i syntesen av isoksazoler vært begrenset. I de rapporterte prosedyrene, er utbyttet av isoksazolproduktene ofte ganske lave. Uønskede reaksjoner fører til urenheter, og begge regioisomerene blir ofte dannet. Videre er ikke nitriloksider veldig stabile og dimeriserer lett, spesielt når elektronrike substituent er til stede. Siden isoksazoler ofte finnes i molekyler med medisinsk interesse, er det ønskelig med en enkel og effektiv prosedyre for syntesen av denne gruppen. Hansen *et al.* rapporterte en one-pot, tre-trinns prosess for regioselektive syntese av 3,5-disubstituterte isoksazoler fra aldehyder og alkyner, hvor nitriloksid, som er mellomproduktet, genereres *in situ* og reagerer videre uten opparbeidelse.

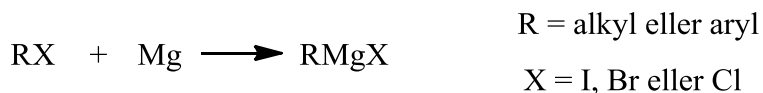
Et aldehyd omdannes først til tilsvarende aldoksim via en reaksjon med hydroksylamin. Uten isolasjon blir aldoksimet omdannet til tilsvarende nitriloksidet ved at det brukes kloramin-T trihydrat, som fungerer som en base. I nærvær av katalytiske mengder kobber (I) vil nitriloksidet reagere med kobber(I)-acetylid komplekset ved romtemperatur. Dette fører til dannelse av 3,5-disubstituerte isoksazoler. Produktene ble fremstilt i moderate til gode utbytter etter en enkel filtrering eller vandig opparbeidelse. Spor av toluensulfonamid og ureagert alkyn fjernes lett ved rekrystallisering, eller ved å filtrere produktet gjennom en kort plug av silika^[51].



Skjema 5.5: Kobber (I) katalysert syntese av 3,5-disubstituerte isoksazoler

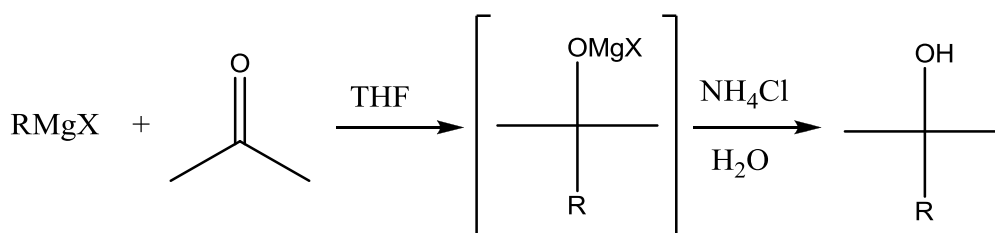
5.3 Grignardreaksjoner

Grignardreagenser dannes i reaksjoner med et organisk halid og magnesiummetall med eter som løsningsmiddel. Rekkefølgen av reaktivitet av halogene med magnesium er $\text{RI} > \text{RBr} > \text{RCl}$.



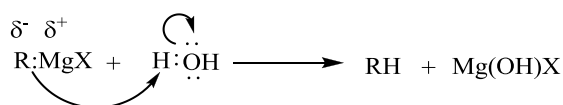
Skjema 5.6: En fremstilling tegning av hvordan Grignardreagenser blir dannet^[62].

Grignardreagenser er særlig nyttig i dannelsen av primære, sekundære og tertiære alkoholer.



Skjema 5.7: Reaksjonsligning for en Grignardreaksjon^[62].

Grignardreagenser er veldig sterke baser. De reagerer med forbindelser som har et hydrogenatom festet til et elektronegativt atom som oksygen, nitrogen eller svovel. Grignardreagenser kan dermed reagere med vann for å produsere alkaner. Grignardreagenser kan ødelegges av vann. Det er dermed viktig å arbeide under vannfrie betingelser når disse reagensene blir brukt.



Skjema 5.8: Grignardreagenser er sterke baser og det vil skje en syre-base reaksjon med vann^[62].

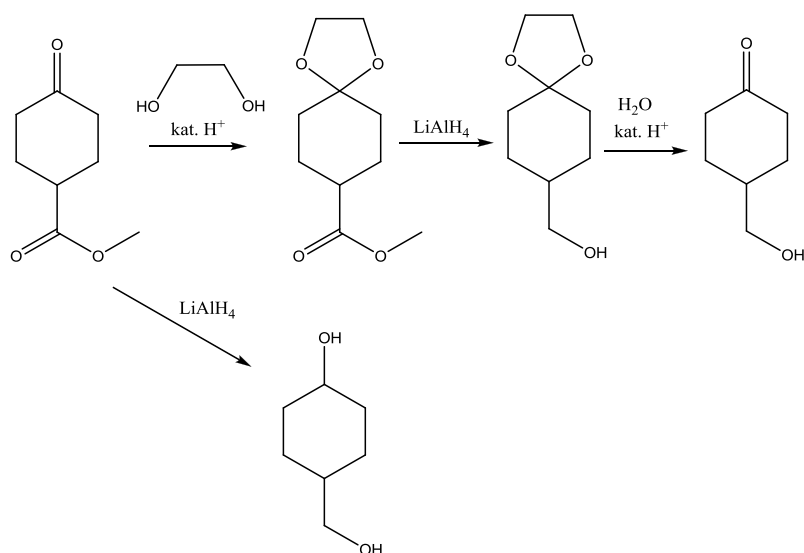
Nøkkelen til funksjonen av Grignardreagenser er polariteten. Karbonatomet er mer elektronegativt enn magnesium. Dette resulterer i δ^- ladning på karbonatomet og δ^+ ladning på magnesiumatomet. Karbonatomet vil da oppføre seg som et karbanion, og har evnen til å gjøre et nukleofilt angrep.

Selv om Grignardreaksjonen er en god metode for å fremstille alkoholer er det ikke uten sine begrensninger:

- Grignardreagenser er en veldig kraftig base. Dermed er det ikke mulig å lage et Grignardreagens fra organiske forbindelser som inneholder et surt hydrogenatom. Det kan heller ikke lages Grignardreagenser fra en forbindelse som inneholder en OH-gruppe, en NH-gruppe, en SH-gruppe, en CO₂H gruppe, eller en SO₃H gruppe. Dersom det ble gjort et forsøk på å lage et Grignardreagens fra et organisk halogen som inneholder noen av disse grupper, vil dannelsen av Grignardreagenset rett og slett ikke skje. Selv om Grignardreagenset skulle dannes, ville det umiddelbart reagere med sure grupper.
- Siden Grignardreagenser er kraftige nukleofiler, kan det ikke lages et Grignardreagens fra alle organiske halogener som inneholder gode elektrofiler som karbonyl, epoksi, nitro- eller cyano-grupper. Dersom det ble forsøkt å gjennomføre en slik reaksjon, vil Grignardreagenset bare reagere med seg selv eller med ureagerte materialer^[62].

5.4 Beskyttelsesgrupper

I mange organiske forbindelser kan noen spesifikke deler av molekylet ikke overleve de nødvendige reagensene eller kjemiske miljøene. Disse delene eller gruppene må da beskyttes. For eksempel er litiumaluminiumhydrid et svært reaktivt, og et nyttig reagens som kan redusere estere til alkoholer. Reagenset vil reagere med karbonylgrupper, og når en reduksjon av en ester er nødvendig i nærvær av et keton, må angrepet fra hydridet på dette karbonylet unngås. Dette kan unngås ved å omdanne ketonet til et acetal, og denne gruppen vil ikke være påvirket av litiumaluminiumhydrid. Acetalgruppen kalles da en beskyttelsesgruppe for ketonet. Etter at reduksjonen av esteren er fullført, må acetalgruppen fjernes, noe som gir tilbake det opprinnelige ketonet. Dette trinnet kalles avbeskyttelse^[63].



Skjema 5.9: Beskyttelsesgrupper kan føre til regioselektiv reaksjon^[63].

Når en kjemisk reaksjon skal utføres selektivt på en reaktiv gruppe i en multifunksjonell forbindelse, må andre reaktive sider bli midlertidig beskyttet. Mange beskyttende grupper har blitt og blir utviklet for dette formålet. En beskyttende gruppe må oppfylle en rekke krav. Den må reagere selektivt for å gi et beskyttet substrat som er stabil for de anslåtte reaksjonene. Den beskyttende gruppen må fjernes selektivt av ikke-toksiske reagenser. Den beskyttende gruppen skal danne et derivat (uten dannelsen av nye stereogeniske sentrer) som lett kan separeres fra side-produkter knyttet til dannelsen eller avspaltning av reagenset^[64].

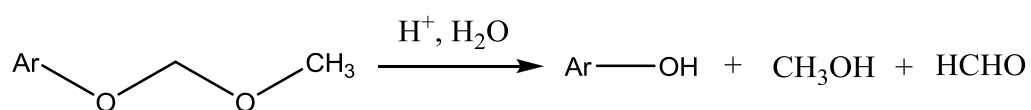
Hydroksylgrupper finnes i en rekke forbindelser av biologiske og syntetiske interesser. Dette inkluderer karbohydrater, steroider og sidekjedene av noen aminosyrer. Når disse forbindelsene skal gjennomgå oksidasjon, acylering, halogenering eller

kondensasjonsreaksjoner, må hydroksylgruppen være beskyttet. MOMCl er et reagens som vanligvis blir brukt for beskyttelse av alkoholer som MOM. Ved hjelp av en base som DIPEA vil MOMCl reagere med alkoholer, og MOM-gruppen kan fjernes ved bruk av fortynnet syre^[65].

Innføring av beskyttelsesgruppen



Fjerning av beskyttelsesgruppen



Skjema 5.10: MOM som beskyttelsesgruppe^[65].

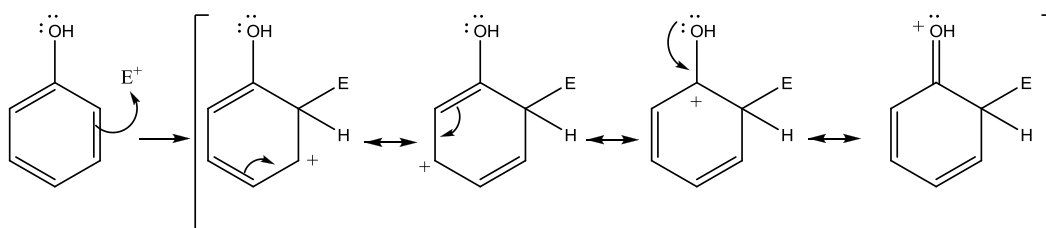
5.5 Orto-formylering

5.5.1 Innledning

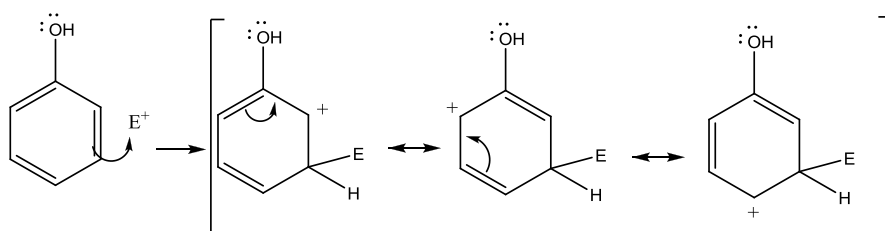
En aromatisk elektrofil substitusjon er en reaksjon hvor et hydrogenatom på den aromatiske ringen byttes ut med en substituent. Dersom benzenringen allerede er substituert og gjennomgår et elektrofilt angrep, så vil gruppen som sitter på ringen påvirke reaksjonshastigheten, og også hvor på ringen dette angrepet skjer. De substituerte gruppene kan inndeles inn i aktiverende- eller deaktivierende grupper.

Substituentene som aktiverer vil gjøre den aromatiske ringen mer reaktiv enn en benzenring, og dette vil øke reaksjonshastigheten. Dette skyldes at denne gruppen av substituentene kan donere elektroner til ringen. OH og NH₂ er sterkt aktiverende grupper. Aktiverende grupper er *orto/para*-dirigerende. Dette forklares ved resonansstrukturer. *Orto*- og *para*-posisjon gir 4 resonansstrukturer, mens *meta* gir kun 3. Med andre ord vil de være mer stabile enn når det skjer et angrep på *meta*-posisjonen.

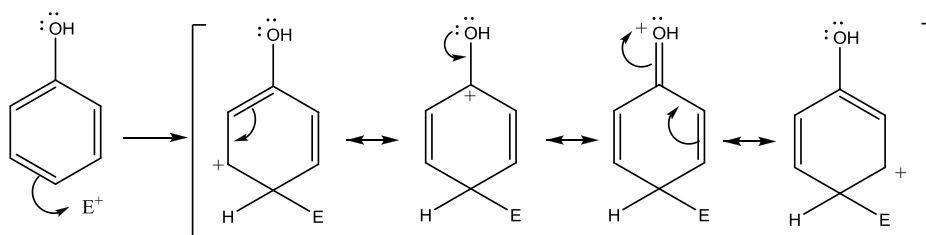
Orto angrep



Meta angrep



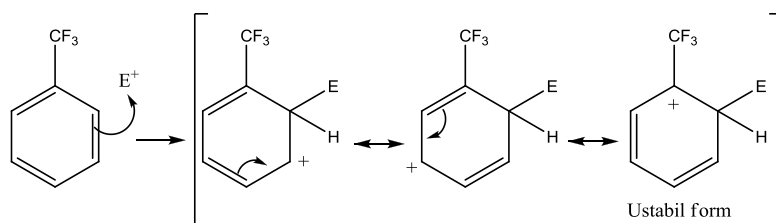
Para angrep



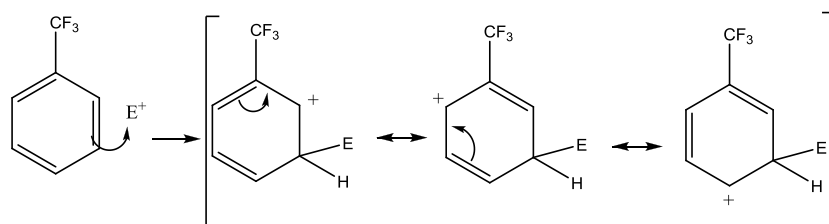
Skjema 5.11: Aktiverende grupper er *orto/para*-dirigerende siden disse danner 4 resonansformer kontra *meta*-posisjonen som danner 3 resonansformer^[66].

I motsetning til de aktiverende gruppene, så vil deaktivierende grupper gjøre benzenringen mindre reaktivt, og vil dermed redusere reaksjonshastigheten. Dette kan forklares ved at gruppen er elektrontiltrekkende og vil trekke til seg elektroner fra ringen. NO₂ og CF₃ er sterke deaktivierende grupper, og disse er *meta*-dirigerende. Dette kan forklares ved resonansstruktur. På *orto*- og *para*-posisjonen er den resonansform som har en positiv ladning på karbonatomet som er bundet til deaktivierende gruppen. Dette gjør at disse forbindelsene er ustabile. Denne formen sees ikke på *meta*-posisjonen, og er dermed mer stabil i forhold *orto*- og *para*-posisjonen^[66].

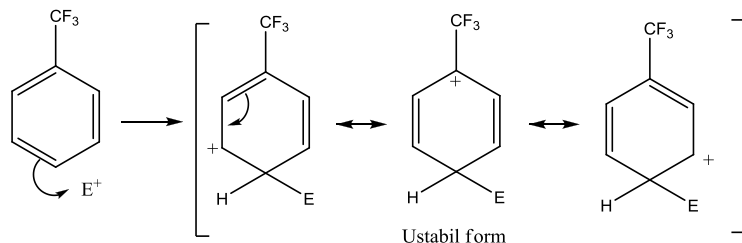
Orto angrep



Meta angrep



Para angrep



Skjema 5.12: Deaktiverende grupper er *meta*-dirigerende siden de danner stabile resonansformer i forhold til et elektrofil angrep på *orto*- og *para*-posisjonene^[66].

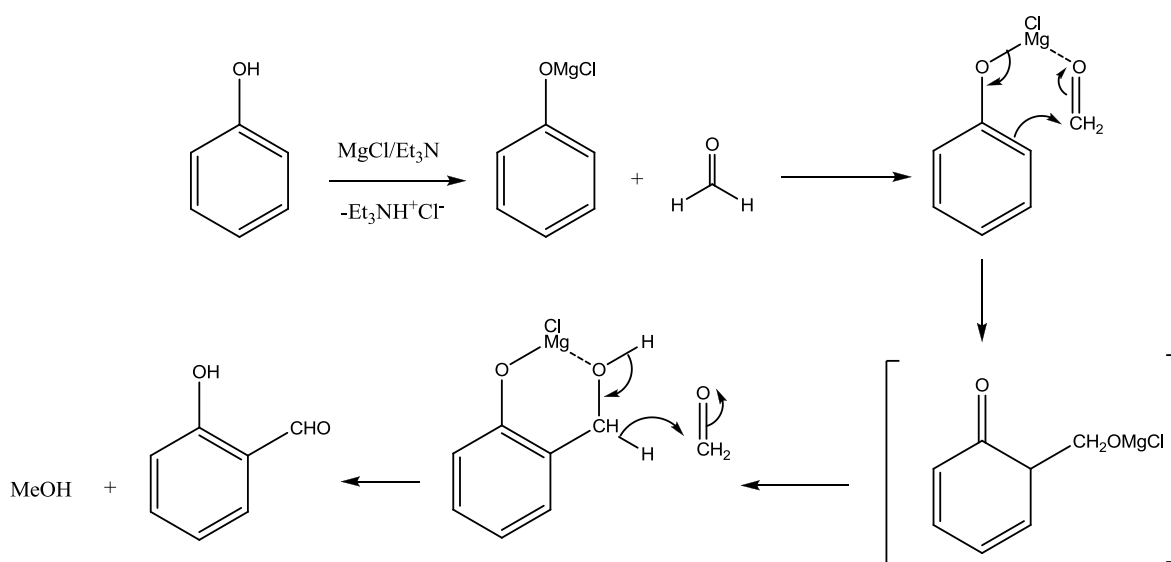
5.5.2 Utviklingen av *Orto*-formyleringsmetoden

Et eksempel på en aromatisk elektrofil substitusjon, er *orto*-formylering av fenoler. *Orto*-formylering er en nyttig metode for fremstilling av salicylaldehyder. Disse forbindelsene er utmerkete forløpere for fremstilling av viktige organiske forbindelse, som for eksempel oksygenholdige heterosykliske forbindelser^[67]. Det finnes en rekke formylering reaksjoner,

men mange av disse gir ofte bare moderat utbytte, og mangel på regioselektivitet. Videre er reaksjonsforholdene tøffe og det benyttes miljøfarlige reagenser.

I 1980 rapporterte Casiraghi og medarbeidere reaksjoner hvor det ble benyttet paraformaldehyd og magnesiumfenoksider i nærvær av HMPTA. Reaksjonene ga utelukkende monoformylering på *orto*-posisjon. Magnesiumioner spilte tilsynelatende en viktig rolle i denne reaksjonen. Dette førte til utviklingen av en ny metode for *orto*-formylering av oksygenerte fenoler. Denne metoden benyttet paraformaldehyd, et basesystem av magnesiumklorid og trietylamin og acetonitril/THF som løsemiddel for å bedre Casiraghi metoden. Dette basesystemet ga høyere utbytte og færre biprodukter. Kombinasjonen av magnesiumklorid og trietylamin er en betydelig sterkere base enn trietylamin alene. Denne kombinasjonen har vært brukt i en rekke base-indusert reaksjoner som acetylering av malonater, kondensasjon av ketoner med isocyantaer og Dieckman-type syklisering.

Det har blitt foreslått at mekanismen for *orto*-formyleringen av fenoler begynner med dannelsen av fenoksimagnesiumklorid, som blir dannet hvor magnesiumklorid reagerer med fenolen. Videre vil intermediet reagere med paraformaldehyd gjennom en sykleheksadienon struktur. Dette resulterer i dannelsen av magnesiumsaltet av salicylalkoholen. Dette intermediet vil i ettertid reagere med annet formaldehyd, og dette vil føre til dannelsen av salicylaldehyd og metanol^[68, 69].



Skjema 5.13: Foreslått mekanisme for *orto*-formylering av fenoler^[69].

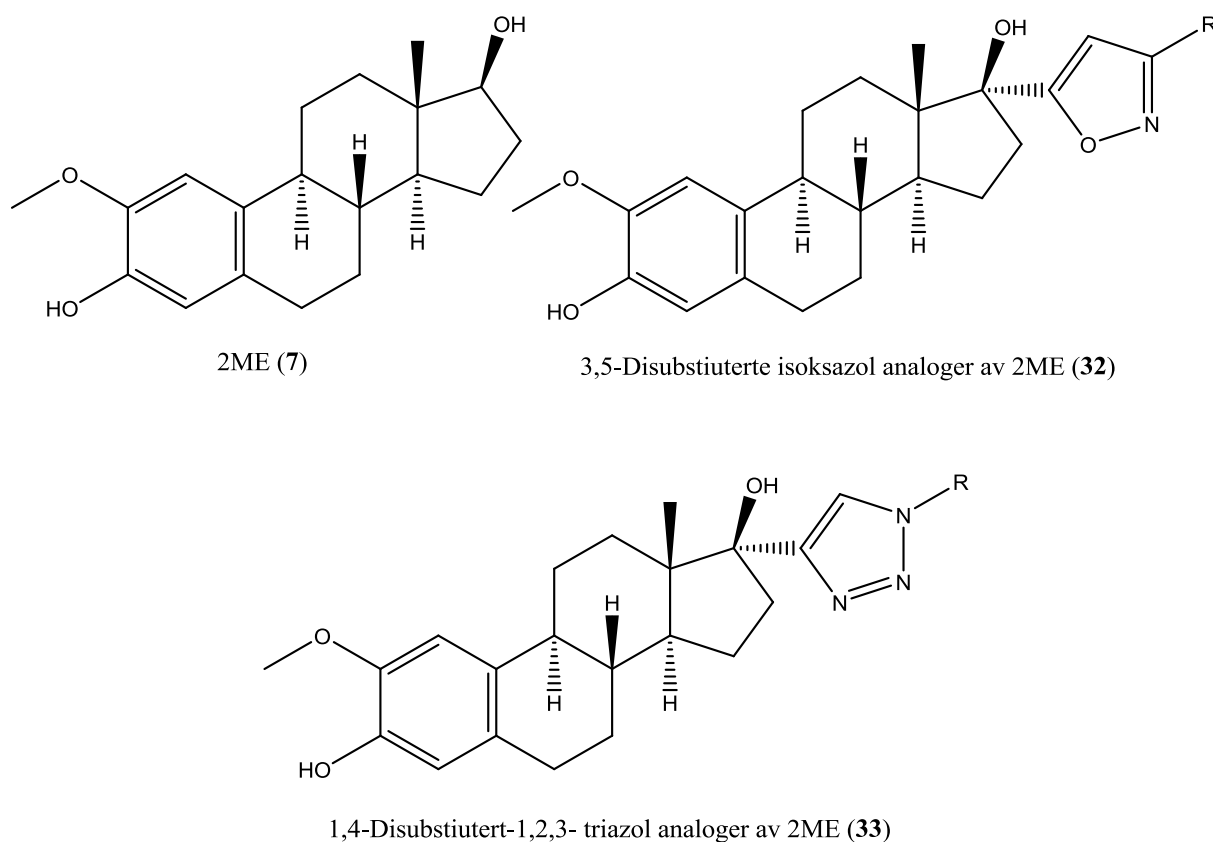
5.6 Mål for oppgaven

2ME viser potent anticancer aktivitet. Dessverre har denne forbindelsen en dårlig farmakokinetisk profil. Den er svært følsom for metabolisme, og det er særlig 2- og 17-posisjonen som er utsatt.

Det har blitt gjort en rekke SAR-studier på 17-posisjonen, men per i dag er det gjort få SAR-studier med heterosykler på denne posisjonen. Det har blitt rapportert at heterosykler øker den antiproliferative effekten av 2ME og vil blokkere metabolismen ved denne posisjonen^[70, 71].

Målet for denne oppgaven var å lage 3,5-disubstituerte isoksazol (**8**) og 1,4-disubstituerte-1,2,3-triazoler (**9**) analoger, i 17-posisjonen i 2ME, samt undersøke cytotoksiske effekter av disse.

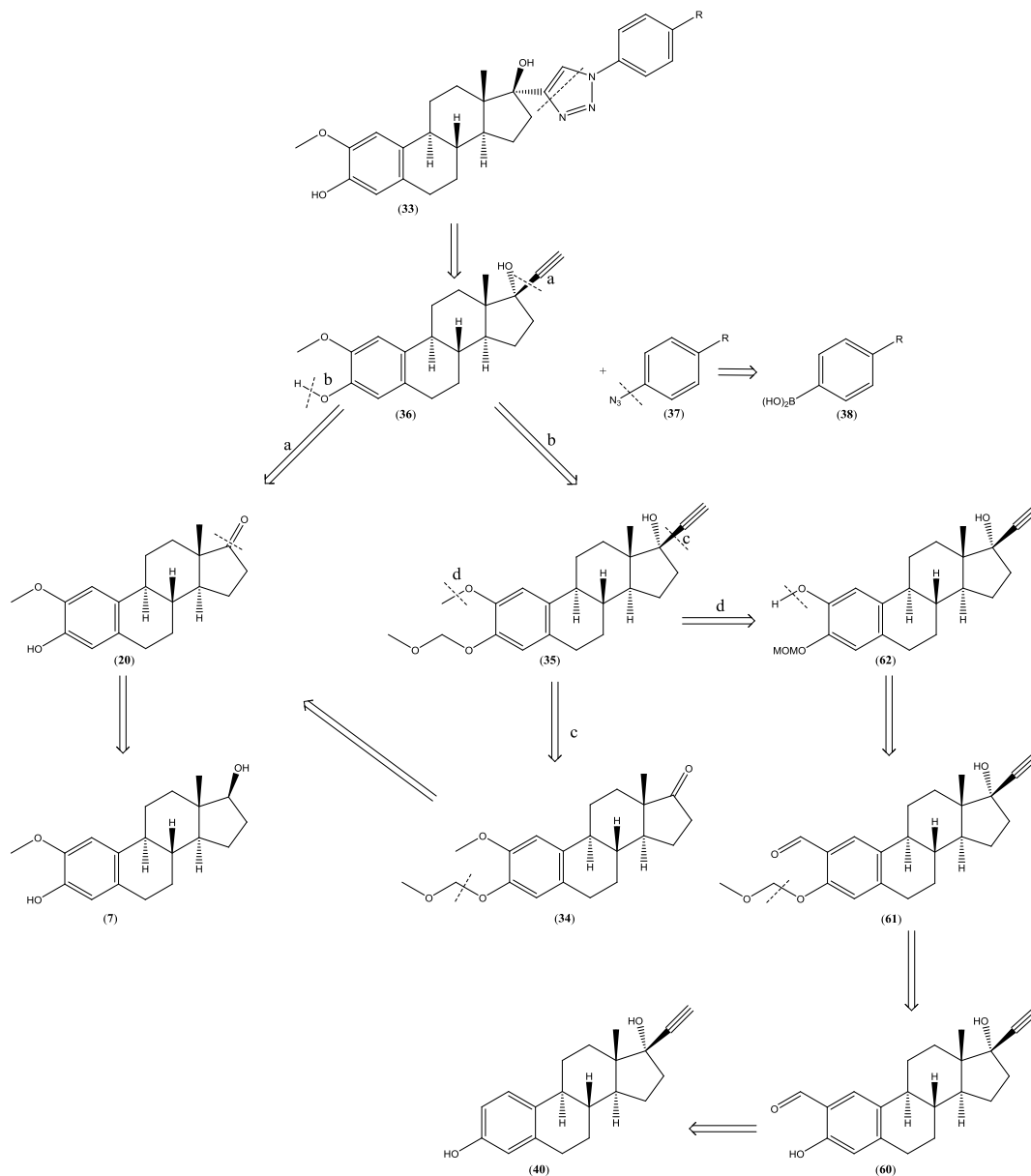
2ME blir dannet ved å utføre *orto*-formylerings reaksjonen eller ved å benytte kommersiell 2ME.



Figur 5.3: 2ME analogene som det ønskes å syntetisere i oppgaven

6 Resultater og diskusjon

6.1 Retrosyntese



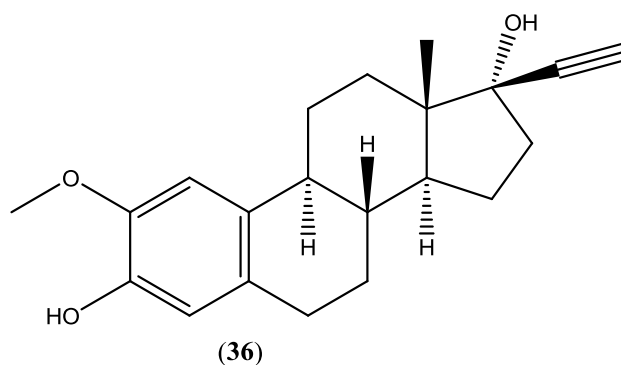
Figur 6.1: Retrosyntetisk analyse av triazolanologen av 2ME

Taktikken var å syntetisere byggsteinene først, og deretter gjøre sykloaddisjonsreaksjonene. Alkynet **36** kan fremstilles ved enten å bruke forbindelse **7** eller **40** som utgangstoff. Begge forbindelsene er kommersielt tilgjengelig.

6.2 Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol

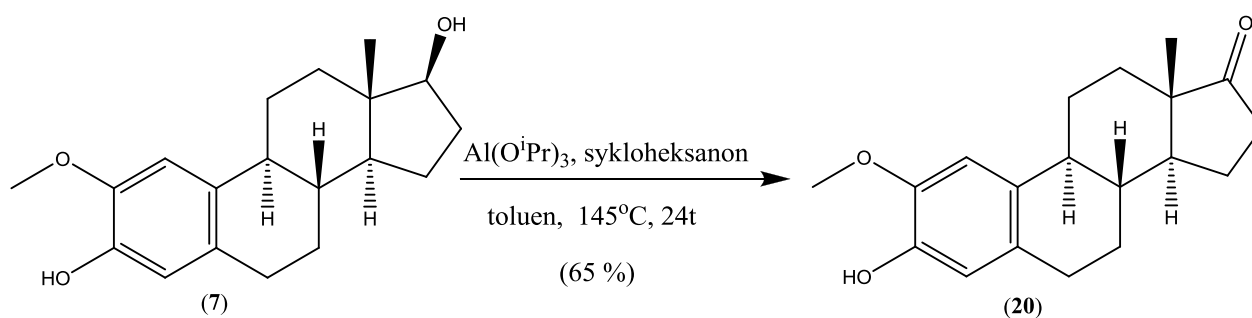
Syntesen av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol (**36**) kan utføres gjennom to forskjellige synteseveier:

1. Den første metoden bruker 2-metoksiøstradiol som utgangsstoffet, og er enten en 2- eller 4-trinnsyntese. Ved 2-trinnsyntesen vil ikke hydroksylgruppen av fenolen bli beskyttet, og med denne metoden unngår man 2-trinn i forhold til 4-trinnsyntese.
2. Den andre metoden benytter 17- β -etynyløstradiol som utgangsstoff, og dette er en 5 trinnsyntese. Dessverre ble ikke denne metoden fullført. Dette skyldes problemer med rensingen av produktet i første trinn og denne metoden ble dermed ikke prioritert.



Figur 6.2: Struktur av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol

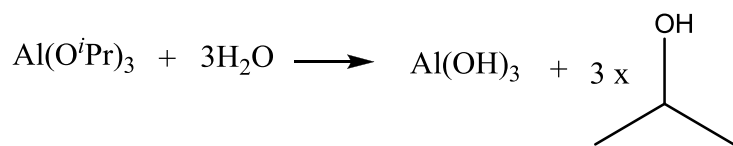
6.2.1 Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol fra 2-metoksiøstradiol



Skjema 6.1: Reaksjonstrinn 1, syntese av 2-metoksi-østradiol.

Det første trinnet i syntesen var en Oppenauer oksidasjon hvor forbindelse **7** ble oksidert i 17-posisjonen. For å lage triazoler og isoksazoler ved klikk-reaksjonen må et terminalt alkyn fremstilles. Tanken bak oksidasjonen var å innføre acetylen-gruppe i 17-posisjonen ved Grignardreaksjonen.

Siden vann kan ødelegge alkoksidet, ble denne syntesen utført under tørre betingelser.



Skjema 6.2: Vann vil hemme Oppenaueroksidasjon ved at de vil reagere med alkoksidet. Det blir dermed dannet aluminiumhydroksid.

Ufordringen ved denne prosedyren var opparbeidelsen. På grunn av mengden av $\text{Al}(\text{O}^i\text{-Pr})_3$ som ble brukt, ble det dannet uønskede aluminiumsalter som foreligger som gule klumper i løsningen. Dette skapte problemer under ekstraksjonen. Problemet ble løst ved å tilsette 3-4 ekvivalenter av iskaldt vann per ekvivalent av aluminiumalkoksidet i løsningen. Dette førte til dannelse av aluminiumhydroksyd. Denne løsningen ble da overført til et begerglass og 1 M HCl ble tilsatt under omrøring. Det ble tilsatt så mye HCl slik at ”klumpene” i løsningen ble løst. Dermed ble ekstraksjonen lettere.

Da løsemiddelet i løsningen skulle dampes av på rotavaporen, ble det igjen en gul oljeaktiv løsning i rundkolben. Dette skyldes at sykloheksanol fantes i løsningen. Alkoholer er en vanlig forurensning som blir dannet ved denne oksidasjonen. Sykloheksanol ble da separert vekk fra løsningen ved å destillere løsningen under vakuum. Etter at omtrent alt sykloheksanol ble eliminert, ble det tilsatt kokende heksan i rundkolben. Det ble så avkjølt ved romtemperatur og deretter plassert i fryseren som over natten. Det ble så dannet hvitt fast stoff på bunnen og løsemiddelet ble dekantert av.

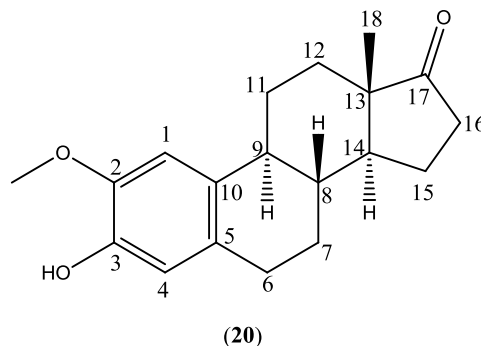
Utbyttet av reaksjonen var på 65 %. I litteraturen har det blitt rapportert et utbytte på 89 %^[29]. Det lave utbytte kan skyldes opparbeidelsen.

På ^1H -NMR spekteret er det to signaler ved 6,79 ppm og 6,66 ppm. Begge disse signalene er singletter og er integrert for 1H. Ved dette ppm-området vil signaler fra aromatiske protoner vanligvis dukke opp. Disse signalene kommer dermed fra protonene på karbon 1 og karbon 4. Hydroksyl- og metoksigruppen er begge elektrondonerende grupper, men hydroksylgruppen er i større grad en sterkere elektrondonerende gruppe enn metoksigruppe. Dette betyr at protonet på karbon 4 vil ha en større shieldingeffekt enn protonet på karbon 1. Signalet ved 6,66 ppm stammer fra protonet fra karbon 4, mens signalet ved 6,79 ppm vil komme fra protonet på karbon 1.

Ved 5,52 ppm dukker det opp en singlett som integrerer for 1H. Signalet fra fenoler kommer i området 4-12 ppm. Dette antas at dette signalet kommer fra protonet i hydroksylgruppen i fenolen.

Det observeres også to signaler ved 3,86 ppm og 0,92 ppm. Begge disse signalene er singletter. Hvert av disse for 3H. Dette indikerer at det er protoner fra metylgrupper som ikke har naboprotoner. Protoner fra metoksigrupper dukker opp ved 3,3 – 4 ppm. Signalet fra 3,86 vil dermed stamme fra protonet i metoksigruppen, mens signalet som dukker opp ved 0,92 kommer fra protonene på karbon 13.

De gjenværende signalene på spekteret finnes i området 1,37 – 2,82 ppm. Alifatiske protoner dukker opp ved dette området. Disse signalene vil da dukke opp fra de gjenværende protonene i forbindelsen.

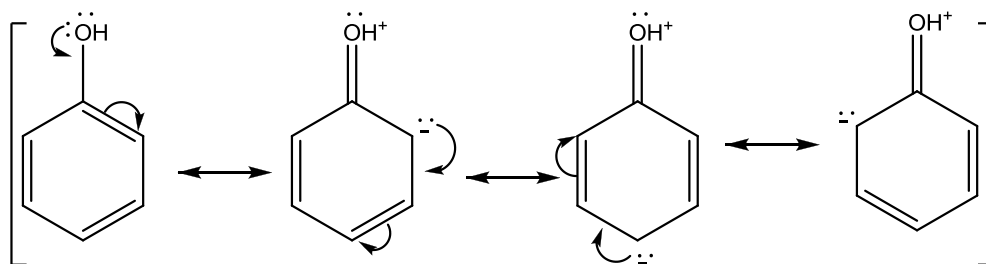


Figur 6.3: Struktur av forbindelse 20

I ^{13}C -NMR spekteret kommer aromatiske karbonatomer mellom 150-90 ppm. På dette spekteret er det 6 signaler som er i dette området og dette betyr at disse kommer fra karbonatomene i aromatiske ringen. De to signalene ved 145,12 og 144,06 ppm er de to som er mest deshielded. Dette betyr at disse kommer fra karbon 2 og karbon 3. Hvilke signaler som representerer hver av dem er vanskelig å avgjøre, men siden hydroksylgruppen har en mer elektrondonerende egenskap enn metoksigruppen, antas det at signalet ved 145,12 kan komme fra karbon 2, mens signalet ved 144,06 ppm kan komme fra karbon 3. Ved å ta 2D-NMR ville det vært mulig å se hvilket signal representer hvilket karbonatom.

Hydroksyl- og metoksigruppene er *orto*- og *para*-dirigerende. Dette vil føre til større elektrontetthet på disse posisjonene, mens *meta*-posisjonen vil ha lavere elektrontetthet. *Orto*-posisjonen vil i noen grad være mer shielded enn *para*-posisjonen, siden karbonatomene ved denne posisjonen ligger i nærheten av hydroksyl- og metoksigruppene. De vil dermed ha lavere kjemiskshiftverdi enn karbonatomene ved *para*- og *meta*-posisjonen. Dermed antas det at karbonatomene 1 og 4 vil gi signaler ved 115,09 og 108,47, hvor karbon 4 vil ha den laveste kjemiskshift verdi på grunn av hydroksylgruppens sterkere elektrondonerende egenskap sammenlignet med metoksigruppen. Karbon 10 er i *para*-posisjon i forhold til hydroksylgruppen, mens karbon 5 er i *para*-posisjon i forhold til metoksigruppen. Med dette

antas det at karbon 10 vil ha lavere ppm-verdi enn karbon 5. Signalene ved 131,51 og 129,67 kan komme fra karbon 5 og karbon 10.



Skjema 6.3: Hydroksylgruppen vil øke elektrontettheten i *orto*- og *para*- posisjonen^[66].

Signalet ved 56,46 ppm kommer ved et område hvor metoksigruppen dukker opp (50-60 ppm). Dette betyr at dette signalet kommer fra karbonet i metoksigruppen i 2-posisjon.

Metylgruppen på 18-posisjon vil ha den laveste shiftverdien. Signalet ved 14,28 ppm vil dermed komme fra dette karbonet.

Resten av signalene representerer de gjenværende alifatiske karbonatomene i **20**.

Totalt er det 18 signaler på ^{13}C - spekteret, men forbindelse **20** har 19 karboner. Karbon 17 er et keton, og ketoner vises ved 185-220 ppm, men det er ingen signal ved dette området. Det ble dermed tatt IR-spekter. På IR-spekter ses det en topp ved 1735 cm^{-1} som er i område for hvor ketonet dukker opp. Det sees også en topp ved 3538 cm^{-1} , og denne toppen kommer fra hydroksylgruppen i fenolen. Dette er dermed en god indikasjon at denne reaksjonen har vært vellykket.

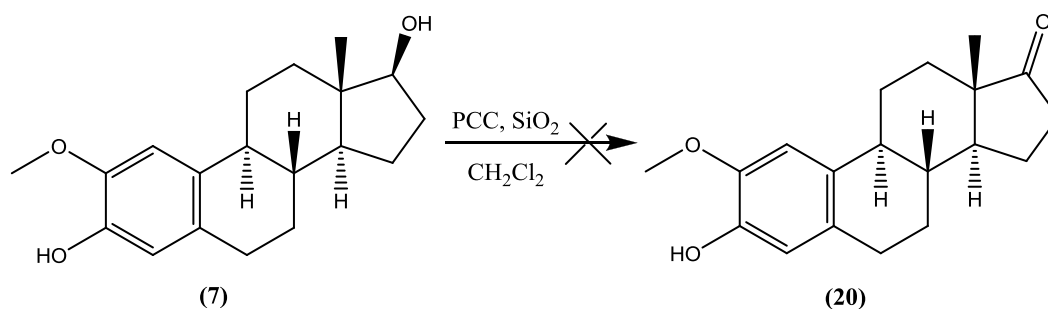
Molekylvekten på forbindelse **20** er 300,39 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 300 og 301, og dette tilsvarer M^+ og $\text{M}^+ + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Smeltepunktet for forbindelse **20** var 159-165 °C, mens i litteraturen har det blitt rapportert et smeltepunkt på 187-190 °C^[29]. Den store forskjellen kan skyldes at forbindelsen ikke er ren.

Oppenauer oksidasjonen skapte en del utfordringer under opparbeidelsen, og det var dermed ønskelig å finne en ny oksidasjonsmetode av 2-metoksi-17- β -østradiol. Dess-Martin oksidasjon er en metode hvor det blir benyttet Dess-Martin perjodinanet. Denne metoden vil selektivt oksidere alkoholer til adehyder eller ketoner. Dette er også en rask reaksjon. Det har

blitt rapportert at denne metoden kan oksidere fenoler^[72]. Siden 2-metoksi-17- β -østradiol har en sekundær alkohol og en fenol, så kan disse gruppene bli påvirket ved Dess-Martin oksidasjon. Fenolgruppen kunne beskyttes med MOM, men sekundære alkoholen kan også bli beskyttet. På grunn av de nevnte mulige selektivitetsproblemer ble ikke denne oksidasjonsmetoden forsøkt.

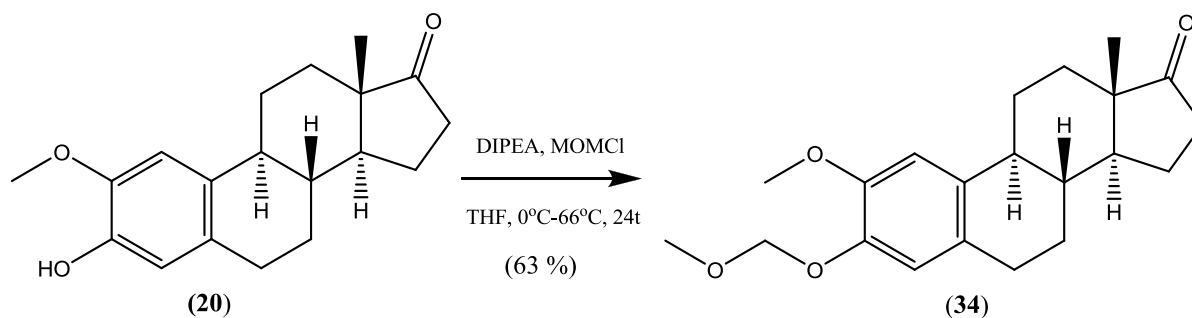
En annen metode var benyttelsen av PCC. Oksidasjon av alkoholer ved PCC er en kjent og en rask metode (4-5 timer). Opparbeidelsen bestod av vakuum filtrasjon. Denne metoden kunne dermed være et alternativ^[73].



Skjema 6.4: Forsøk på å syntetisere 2-metoksi-østron (20) ved PCC-kjemi^[73].

Denne metoden ble utført to ganger. Dessverre viste TLC ingen tegn til oksidasjon av alkoholen. Allikevel ble reaksjonen opparbeidet slik at ¹H-NMR spekter av reaksjonen kunne tas. Spekteret viste ingen tegn til oksidasjon. Mulige grunner til at oksidasjonen ikke gikk, er at PCC reagenset kanskje var av dårlig kvalitet, eller at reaksjonsbetingelsene ikke var optimalt. Dette ble ikke gjort under tørre betingelser og dette kan være en faktor som hindret en vellykket reaksjon. Reaksjonsblandingen stod i 8 timer ved romtemperatur. Reaksjonstiden og temperaturen kan også være en annen faktor. Mulig at reaksjonen skulle stått over natten, og ved høyere temperatur.

Oppenaueroksidasjon ble dermed benyttet når det skulle lages mer av forbindelse 20.



Skjema 6.5: Reaksjonstrinn 2, syntese av 2-metoksi-3-O-metoksimetyl-østron

Forbindelse **20** har en fenolgruppe og denne gruppen kan skape problemer når Grignard reaksjonen skulle utføres. Protonet på fenolen har en pKa på ca 9-11. Siden Grignard reagenser er sterke baser, så kan det skje en syre-base reaksjon mellom fenolen og Grignard reagentet. Grignard reagentet kan dermed bli ødelagt. Det ble dermed bestemt at i neste trinn skulle OH-gruppen i fenolen beskyttes med MOMCl.

MOMCl er veldig reaktiv mot nukleofiler. Vann er nukleofil og dersom vann er tilstede, kan MOMCl reagere med vann og ikke med forbindelse **20**. Dette betydde at reaksjonen måtte utføres under tørre betingelser.

Ved tilsetning av MOMCl i DIPEA-løsning vil varme bli utviklet siden dette er en eksoterm reaksjon, kan eksoterm tilstand forekomme. Ved eksoterm tilstand kan kontrollen over reaksjonen forsvinne. Det kan dermed skje uventende reaksjoner. For å unngå dette ble temperaturen i løsningen sunket til 0 °C og MOMCl ble tilsatt dråpevis til løsningen.

Reaksjonen ga et utbytte på 63 %. I litteraturen har det den samme syntesen på østradiol blitt utført, og det har blitt rapportert et utbytte på 89 % for denne forbindelsen^[29]. Det lave utbyttet kan skyldes at teknikken var dårlig utført når det gjelder tilsetning av stoffene, eller at reagensene ikke var av god kvalitet. MOMCl reagentet ble åpnet for første gang i 2003. Det ble tatt ¹H-NMR av MOMCl reagentet og dette avkreftet denne mistanken.

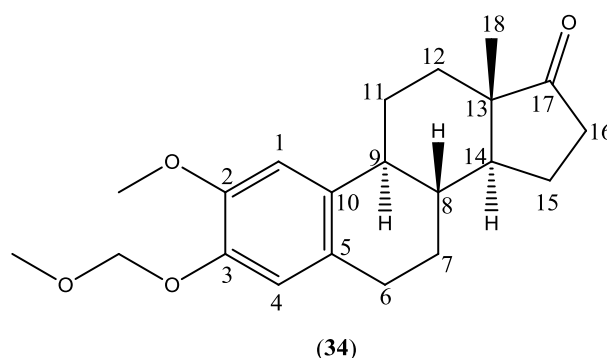
På ¹H-NMR spekteret har det skjedd tre forandringer i forhold til spekteret av forbindelse **20**.

De to protonene som er på den aromatiske ringen har nå en ppm-verdi på 6,88 og 6,83. Dette skyldes at OH-gruppen i fenolen er nå beskyttet av MOM. Ar-O-MOM-gruppen er ikke like sterk elektrondonerende gruppe i forhold til OH-gruppen. Dette gjør at begge protonene på aromaten for forbindelse **34** får en større deshieldingseffekt, sammenliknet med de to protonene på aromaten til forbindelse **20**. Dette betyr at disse protonene vil ha en høyere ppm-

verdi.

Det er vanskelig å si hvilke signaler som representerer de to protonene, men siden Ar-O-MOM gruppen består av to oksygenatomer, så kan det gi en større shieldingeffekt enn metoksigruppen. Tatt til betraktning så er det mulig at protonet på karbon 1 har signalet som har en ppm verdi på 6,88, mens signalet på 6,83 ppm stammer fra protonet på karbon 4.

Ved å ta et 2D-NMR spekter er det mulig å identifisere hvilke signaler som kommer fra hvilke karbonatomer.



Figur 6.4: Struktur av forbindelse 34

Signalet som dukket opp ved 5,52 ppm i spekteret til forbindelse **20**, er ikke å finne på dette spekteret. Dette gir en indikasjon på at reaksjonen har vært vellykket og signalet ved 5,52 ppm i spekteret for forbindelse **20** representerer hydroksylgruppen i fenolen.

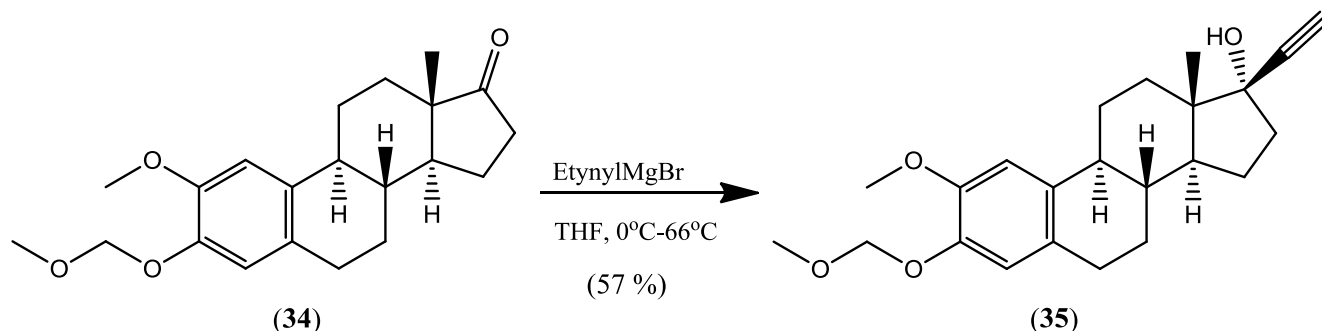
På dette spekteret har det dukket opp to nye singletter ved 5,19 ppm og 3,51 ppm. Disse singlettene representerer de protonene som finnes på Ar-O-MOM gruppen. CH₂-gruppen som ligger mellom de to oksygenatomene i Ar-O-MOM gruppen, vil få en deshieldingeffekt og en høyere ppm verdi sammenliknet med CH₃-gruppen. Samtidig integrerer singletten ved 5,19 ppm for 2H, mens singletten ved 3,51 ppm for 3H. Dette betyr at denne singletten ved 5,19 ppm representerer protonene i CH₂-gruppen, mens singletten ved 3,51 ppm representerer protonene i CH₃-gruppen.

Disse forandringene som ble sett på ¹H-NMR spekteret ble også sett på ¹³C-NMR spekteret. Det dukket opp to nye signaler ved 95,92 ppm og 56,54. Signalet ved 95,92 ppm vil komme fra CH₂-gruppen, mens signalet ved 56,54 ppm kommer fra CH₃-gruppen. De aromatiske signalene er også litt lavere i forhold til spekteret for forbindelse **20**. Dette skyldes som sagt at Ar-O-MOM ikke er en like sterk elektrondonerende gruppe som hydroksylgruppen.

Det ble også tatt IR-spekter av denne forbindelsen, siden signalet til ketonet ikke var å finne på ¹³C-NMR spekteret. På dette spekteret dukket det opp en topp ved 1733 cm⁻¹ og toppen for hydroksylgruppen ble ikke observert på IR-spekteret. Reaksjonen har vært vellykket.

Molekylvekten på forbindelse **34** er 344,44 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 344 og 345, og dette tilsvarer M^{+} og $M^{+} + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

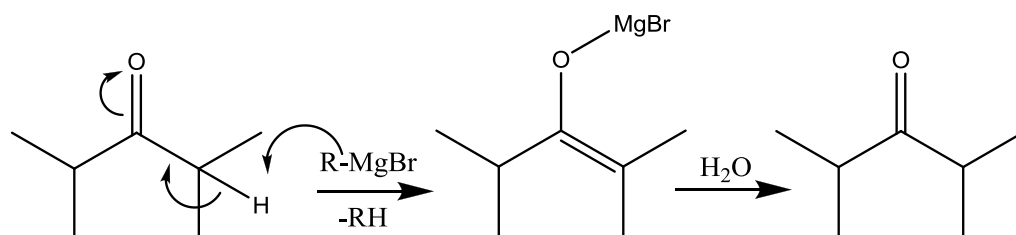
Smeltepunktet for forbindelse **34** var 120-124 °C.



Skjema 6.6: Reaksjonstrinn 3, syntese av 2-metoksi-3-O-metoksimetyl-17- β -etynyløstradiol

Som alle Grignardreagenser er etynylmagnesiumbromid en sterk base. Ved vann tilstedet, kan det forekomme en syre-base reaksjon. Dette vil ødelegge reagenset og dermed vil ikke den ønskede reaksjonen forekomme. Syntesen ble dermed utført under tørre betingelser.

Grignardreagenser er også sterke nukleofiler. Vanligvis vil reagenset gjøre et nukleofilt angrep på karbonylatomet, men reagenset kan også plukke opp et α -proton. Det kan dermed skje en aldol kondensasjon, og ved opparbeidelsen vil det bli gjendannet til den originale karbonylforbindelsen.



Skjema 6.7: Aldol kondensasjon er en uønsket reaksjon som ikke ønskes under Grignardreaksjon

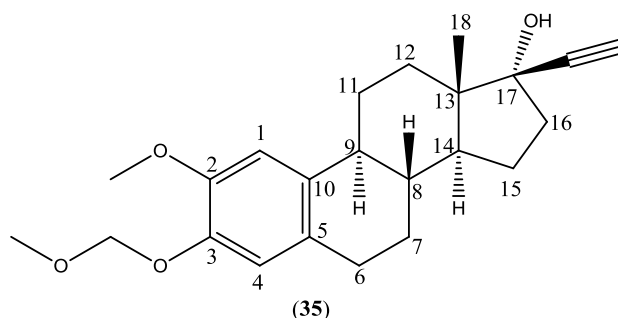
Dette ble unngått ved først å tilsette Grignardreagenset i rundkolben først og temperaturen ble senket ned til 0 °C. Løsning av forbindelse **34** i THF ble så tilsatt dråpevis. Selektiviteten av reaksjonen kan dermed oppnås slik at alkoholen blir dannet.

Når TLC analyse viste intet startmateriale tilstede ble det tilsatt vandig 2 M ammoniumkloridløsning for å stoppe reaksjonen. Dette sørger for at enolationene blir protonert, og alkoholen blir dannet.

Reaksjonen ga et utbytte på 58 %. En lignende syntese har blitt utført, men i denne syntesen blir det innført en metylgruppe på 17-posisjonen. Utbyttet som ble rapportert i denne reaksjonen var 73 % ^[29]. Det skal i teorien være lettere å innføre alkyn gruppe, siden alkynet har en lineær geometri. Det lave utbyttet kan dermed skyldes dårlig teknikk som ble benyttet under syntesen.

Ved denne reaksjonen vil et terminalt alkyn bli innført ved 17-posisjonen. Det skal da dukke opp et ekstra signal på dette ¹H-NMR spekteret i forhold til spekteret til forbindelse **34**. Protoner fra terminale alkynet dukker opp ved området 2,0 – 3,5 ppm. På spekteret observeres det en singlett ved 2,61 ppm og har et integral på 1H. Dette signalet representerer dermed protonet på alkynet.

På ¹³C-NMR spekteret vil et terminalt alkyn gi to signaler, og disse kom ved 95,93 og 74,45 ppm. $\equiv\text{CH}$ vil ha en lavere kjemiskshift verdi enn $\equiv\text{CR}$, og dette betyr at signalet ved 74,45 ppm kommer fra terminal karbonet, mens 95,93 ppm representerer det andre karbonet i alkyngruppen.

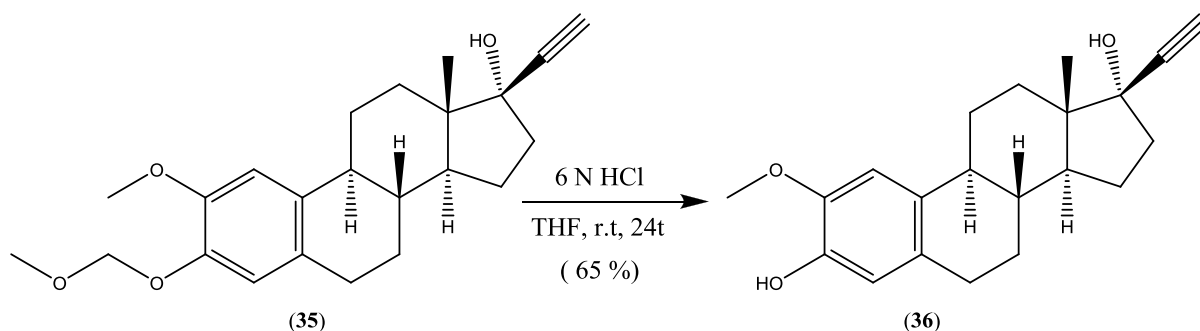


Figur 6.5: Struktur av forbindelse **35**

Karbonatomet i 17-posisjonen kom ikke frem i dette spekteret. Kvartenær karbon atom gir svake signaler. Dette spekteret ble tatt opp i 300 MHz med 1024 skann, og det kan tyde på at antall skann var for lavt. Dette må eventuelt økes for at signalet på kvartenære karbonatomet vil dukke opp. Dersom dette karbonatomet eksisterte ville det dukke opp topper for alkynet på et IR-spekter. Det ble dermed tatt IR-spekter. Alkyner kommer ved 2100-2260 cm^{-1} . På IR-spekteret for denne forbindelsen dukket det en topp ved 2306 cm^{-1} . Dette gir dermed en god indikasjon på at kvartenær karbon atomer gir svake signaler og reaksjonen har vært vellykket.

Molekylvekten på forbindelse **35** er 370,48 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 370 og 371, og dette tilsvarer M^+ og $\text{M}^+ + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Smeltepunktet for forbindelse **35** var 145-150 °C.

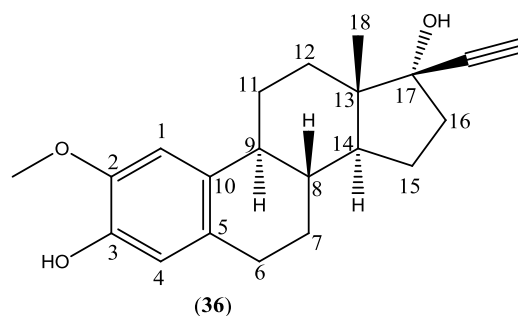


Skjema 6.8: Reaksjonstrinn 3, syntese av 2-metoksi-17-β-etynyløstradiol

Ved dette trinnet debeskyttes MOM-gruppen. Det ble brukt et stort overskudd av vandig HCl under denne reaksjonen. Det er dermed viktig at HCl blir nøytralisert under opparbeidelsen. Mettet bikarbonat løsning ble dermed tilsatt under opparbeidelsen.

Reaksjonen ga et utbytte på 65 %. En lignende reaksjon har blitt utført, men med en annen 2ME analog. Det ble rapportert et utbytte på 69 % ^[29].

Ved disse betingelsene ble MOM-gruppen fjernet, og siden denne reaksjonen var vellykket skulle det ikke vises singletter ved shiftverdiene 5,19 og 3,51 ppm i ¹H-NMR-spekteret. Disse signalene representerer CH₂- og CH₃ gruppen i MOM. Disse signalene ble ikke observert på dette spekteret. En annen forandring på ¹H-NMR spekteret, er at de to signalene fra protonet på aromatene har en lavere shiftverdi sammenlignet med spektret for forbindelse **35**. Shiftverdiene i dette spekteret er ved 6,80 og 6,64 ppm. Dette er omtrent de samme ppm-verdiene som de to protonene i spekteret til forbindelse **20**. I tillegg til at to singletter er borte fra spekteret, er disse to endringene en god indikasjon på at reaksjonen har vært vellykket.



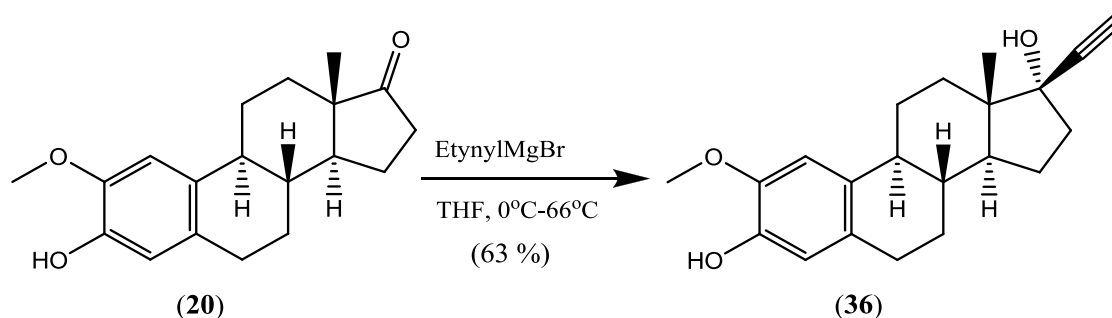
Figur 6.6: Struktur av forbindelse **36**

De samme endringene som ble sett på ¹H-NMR spekteret ble også sett på ¹³C-NMR spekteret. Signalene ved 95,93 og 56,53 ppm fantes ikke på dette spekteret, og de aromatiske karbonatomene har fått noe lavere shiftverdi.

Det kvartenære karbonatomet ved C-17 var heller ikke her å finne på dette spekteret. Det ble dermed tatt IR-spekter. På IR-spekter sees det topper ved 3572 - og 2306 cm⁻¹. Dette er topper som kommer fra hydroksylgruppene og alkyngruppen.

Molekylvekten på forbindelse **36** er 326,43 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 326 og 327, og dette tilsvarer M^{+} og $M^{+} + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Smeltepunktet for forbindelse **36** var 137-141 °C.

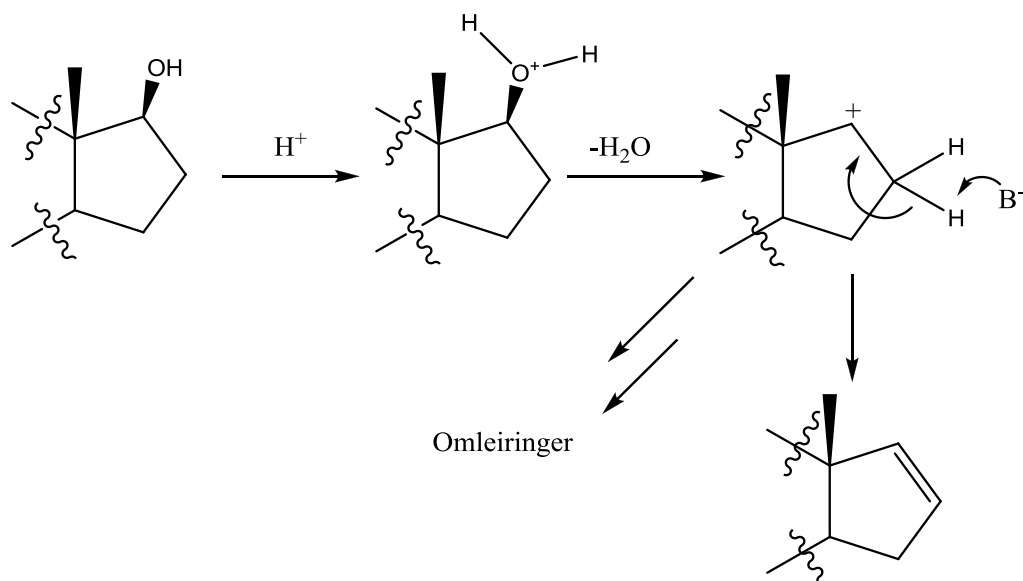


Skjema 6.9: Grignardreaksjon på forbindelse **20** for fremstilling av **36**

For å spare tid, ble det forsøkt å syntetisere forbindelse **36** ved å utføre Grignardreaksjonen på forbindelse **20**. Dersom dette ble vellykket, ville to trinn unngås (beskyttelse og avbeskyttelse) på veien mot syntesen av forbindelse **36**. Som det har blitt nevnt tidligere, er Grignard reagenser sterke baser og nukleofiler. Dette betyr at reagenset vil reagere med fenolgruppen og karbonyl karbonatomet. Det er ønskelig å omdanne ketongruppen til en tertiær alkohol. Molare ekvivalenter må da økes, slik at når Grignardreagenset har blitt ødelagt på grunn av reaksjonen med fenol, så vil det fortsatte være nok av reagenset i løsningen som kan reagere med karbonyl atomet. Bortsett fra økningen av den molare mengden av etynylmagnesiumbromid, var prosedyren det samme som i fremstillingen av forbindelse **35**.

Når reaksjonen var ferdig, ble vandig 2 M ammoniumkloridløsning tilsatt. Det var viktig at vannfasen hadde pH på 5-7. Dette vil da sørge for at fenolen ble protonert. Dersom dette ikke blir gjort, vil forbindelsen være ionisk og bli i vannfasen, og produktet vil gå tapt under ekstraksjonen. pH i vannfasen ble justert med ammoniumklorid. Det skal ikke justeres med sterk syre som for eksempel HCl. Dersom HCl blir benyttet er det stor fare for syre-katalysert dehydratisering, og det blir heller dannet dobbel binding enn alkohol. Dette kunne vært av

interesse for å lage 16-17 alken analoger av 2ME. Dessverre er dehydratisering av C-17 alkoholer vanskelig for steroiderⁱ.



Skjema 6.10: En skisse over en mulig dannelse av C16-C17 alken analoger av 2ME.

Det ble utført to testreaksjoner med forskjellige molar ekvivalenter av etynylmagnesiumbromid. Det ble først brukt 5 molare ekvivalenter av etynylmagnesiumbromid, men reaksjonen var ikke vellykket da utbyttet ble kun 10 %.

Neste reaksjon ble vellykket. Det ble brukt 10 molar ekvivalenter Dette ga et utbytte på 63 %. Denne prosedyren ble dermed brukt fremover da det skulle syntetiseres mer av forbindelse **36**.

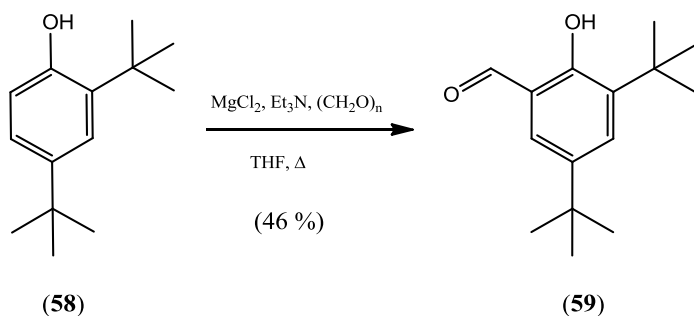
Smeltepunktet, ^1H - og ^{13}C -NMR spekter, IR-spekter og MS-spekter, er lik spekteret til 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol som ble syntetisert ved desbeskyttelse av MOM-gruppen av forbindelse **35**.

ⁱ Personlig meddelelse fra stipendiat Ø.W. Akselsen og førsteamanuensis T.V. Hansen: upublisert studier med Burgess-reagenset

6.2.2 Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol fra 17- β -etynyløstradiol

Fremstillingen av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol kan også gjøres ved å bruke 17- β -etynyløstradiol som startmaterialet. Men da må det aromatiske ringen A-ringen omdannes til 2-metoksi-system ved hjelp av *orto*-formylering

Dermed ble reaksjonen innarbeidet ved å fremstille **59** fra **58**



Skjema 6.11: Testreaksjon med 2,4-*di-tert*-butylfenol

Vann er en nukleofil og kan reagere med formaldehyd. Dette vil resultere i dannelsen av metanol. Paraformaldehyd er et viktig reagens i *orto*-formyleringen, og vann kan dermed ødelegge denne reaksjonen. Det må derfor arbeides under tørre betingelser og bruke tørre reagenser.

Under *orto*-formyleringen blir det dannet magnesiumsaltet av fenolen. Det er dermed viktig å tilsette HCl slik at enolatforbindelsen blir protonert, ellers vil dette forsvinne sammen med vannfasen under opparbeidelsen.

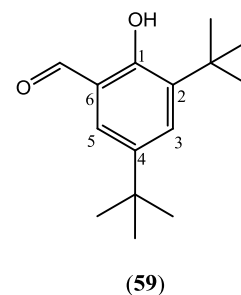
Utbyttet for denne reaksjonen var 46 %.

I ^1H -NMR spekteret for forbindelse **59** vises 6 signaler.

Ved 1,34 og 1,45 ppm dukker det opp to singletter med 9 protoner hver. Dette området er i det *alifatiske* området. De to signalene kommer dermed fra de to *tert*-butylgruppene. Hver av *tert*-butylgruppene har 3 metylgrupper, og dermed 9 protoner. Protonene fra hver av *tert*-butylgruppene er ekvivalente, slik at de to *tert*-butylgruppene vil vise to singletter. Signalene kommer dermed fra protonene i de to *tert*-butylgruppene. Siden 3-*tert*-butylgruppen ligger i nærheten av fenolen, kan singlettten ved 1,34 ppm representere denne gruppen, mens singlettten ved 1,45 ppm representerer 5-*tert*-butylgruppen.

Ved 7,60-7,61 ppm og 7,36-7,35 ppm vises to dubletter. I dette området vil protonene fra aromatiske området dukke opp. Den aromatiske ringen i 3,5-*di-tert*-butyl-2-hydroksybenzaldehyd er det kun karbon 4 og karbon 6 som har proton på seg. Begge har en koblingskonstant på 2,3 Hz og dette indikerer på *meta*-kobling. Dette betyr at de to signalene kommer fra disse protonene. Protonet på karbon 10 ligger i nærheten av aldehyd gruppen. Dette vil gi en deshieldingseffekt. Dubletten som er ved 7,60-7,61 ppm representerer protonet på karbon 6, mens dubletten ved 7,36-7,35 ppm representerer protonet på karbon 4.

Signalet ved 9,88 ppm kommer fra protonet i hydroksylgruppen. I følge litteraturen kan signalet fra fenol variere fra rundt 4-12 ppm. Hydroksylgruppen vil danne intramolekylære hydrogenbindinger med aldehydet, og dette vil gi en høyere ppm-verdi.



Figur 6.7: Struktur av forbindelse 59

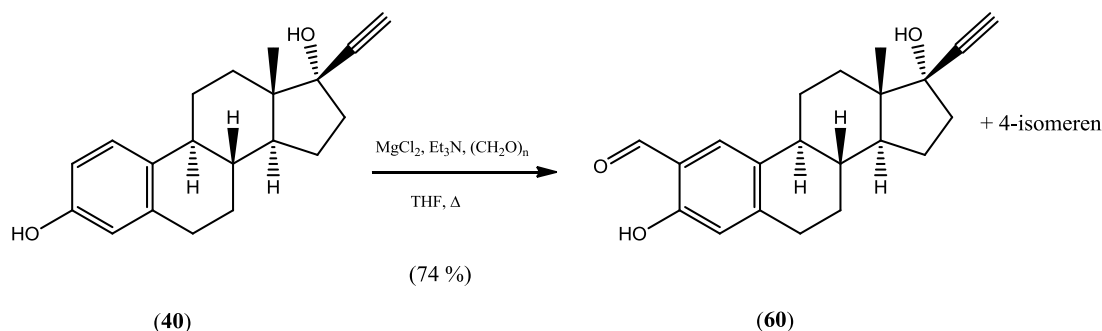
Litteraturen sier også protonet fra aldehyd kan forventes fra rundt 9,5-12 ppm. Det betyr at signalet fra 11,65 kommer fra protonet i aldehydgruppen.

^{13}C -NMR spekeret observeres 11 signaler.

Ved 197,7 ppm vises det signal for karbonatomet i aldehydgruppen. Ved 35,2 ppm og 34,5 ppm kommer signalene fra tertiært karbonatomene i *tert*-butylgruppene. Hver av *tert*-butylgruppene har tre metylgrupper, og disse er ekvivalente slik at forventes bare et signal fra metylgruppene i hver av *tert*-butylgruppene. De to signalene ses ved 31,5 ppm og 29,5 ppm. De andre signalene ved 159,3 ppm, 141,8 ppm, 137,6 ppm, 132,1 ppm, 128,1 ppm og 120,2 ppm forventes å komme fra de seks aromatiske karbonatomene^[74].

Det ble ikke tatt smeltepunkt for forbindelse 59.

Ved neste reaksjon skal det utføres *orto*-formylering på forbindelse 40.

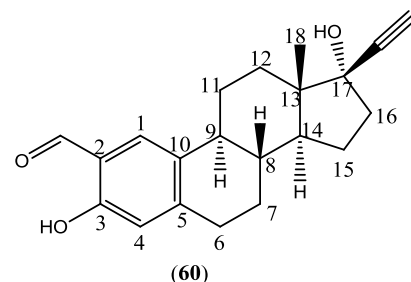


Skjema 6.13: Reaksjonstrinn 1, syntese av 17- β -etynyløstradiol- 2-karbaldehyd

Ubyttet for denne reaksjonen var 74 %.

I ^1H -NMR spekteret observeres det to singletter ved 10,78 og 9,82 ppm. Protonene i aldehyder vil ha høyere kjemisk shiftverdi i forhold til hydroksylgruppen. Singlettene ved 10,78 og 9,82 ppm representerer protonene i aldehydet og hydroksylgruppen.

To singletter ble observert ved 6,70 og 7,43 ppm. Dette ligger i det aromatiske området og kommer fra protonene i karbon 2 og karbon 4. Siden hydroksylgrupper er elektrondonerende grupper, og aldehydet er elektrontiltrekkende grupper, vil singlettene ved 6,70 ppm representere protonet på karbon 4, mens singlettene ved 7,43 ppm representerer protonet på karbon 2.



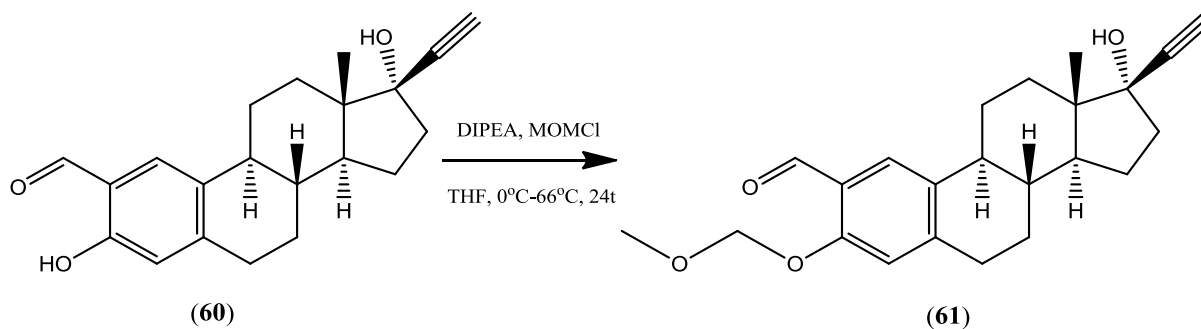
Figur 6.8: Struktur av forbindelse 60

Ved 2,61 ppm ble det observert en singlett som er protonet i alkyngruppen. Ved 0,90 ppm dukker det opp singlett som integrerer for 3H. Dette representerer protonene fra metylgruppen i 13-posisjonen.

Ved 2,92-2,85 ppm, 2,54-2,00 ppm og 1,36-1,05 ppm observeres multipler. Disse multiplene ligger i det alifatiske området, og disse signalene vil da komme fra de resterende protonene i forbindelsen.

Ved denne reaksjonen kan *orto*-formyleringen skje ved 2-posisjon og 4-posisjon. Denne prosedyren gir en høyere regioselektivitet for 2-posisjon. På dette spekteret dukker det opp små signaler ved 11,99-, 10,38- og 8,17 ppm. Disse signalene kommer fra 4-isomeren. Disse utgjør omtrent 4-5 %.

Dessverre ble det ikke tatt ^{13}C -NMR spekter og smeltepunktet for denne forbindelsen.



Skjema 6.14: Reaksjonstrinn 2, syntese av 3-O-metoksimety-17- β -etynyløstradiol- 2-carbaldehyd

Ved neste trinn skulle fenolgruppen beskyttes med MOMCl. Denne reaksjonen viste seg å være utfordrende. TLC viste ingen eller lite omdannelse av startmaterialet et 24 timer. Reaksjonsblanding ble opparbeidet og det ble tatt $^1\text{H-NMR}$ spekter av reaksjonsblandingen. Dette ble gjort for å se om noe startmateriale hadde reagert.

Dersom denne reaksjonen gikk, så vil det forventes at singletten som kommer fra protonet i hydroksylgruppen, ville være borte i dette spekteret. I $^1\text{H-NMR}$ spekteret observeres en singlett ved 9,77 ppm. Dette kan være protonet på hydroksylgruppen. Samtidig skulle protonene på aromatiske ringen ha en høyere ppm verdi i forhold til de samme protonene i startmaterialet. Dette skyldes at Ar-O-MOM forbindelsen har mindre elektrondonerende egenskap sammenlignet med hydroksylgruppen. På spekteret sees to singletter ved 7,39- og 6,64 ppm. Disse shift verdiene var omtrent det samme som i startmaterialet. Det ble dermed tolket slik at reaksjonen ikke gikk, men det denne tolkningen var dessverre feil. Det viser seg at spekteret inneholder signaler fra utgangstoffet og produktet.

I spekteret kommer det en singlett ved 10,39 ppm. Denne singletten stammer fra protonet på aldehydet. Denne shift verdien er noe lavere sammenlignet med det samme singletten i startmaterialet. Dette skyldes trolig Ar-O-MOM ikke danner ingen eller lite intermolekylær interaksjon med aldehydet. På det aromatiske området er det ikke bare to singletter, men fire singletter. Singlettene ved 7,73 og 6,88 ppm kommer trolig fra protonene i aromatiske ringen i produktet. Disse singlettene har høyere shift verdi sammenlignet med de samme de to andre singlettene. I tillegg til shift verdien til protonet på aldehydet, kan dette indikere på at denne løsningen inneholder både startmaterialet og produktet.

Dessverre ble ikke dette oppdaget etter at reaksjonsblandingen ble forkastet. Dersom dette har blitt renset med kromatografi, kunne produktet bli isolert.

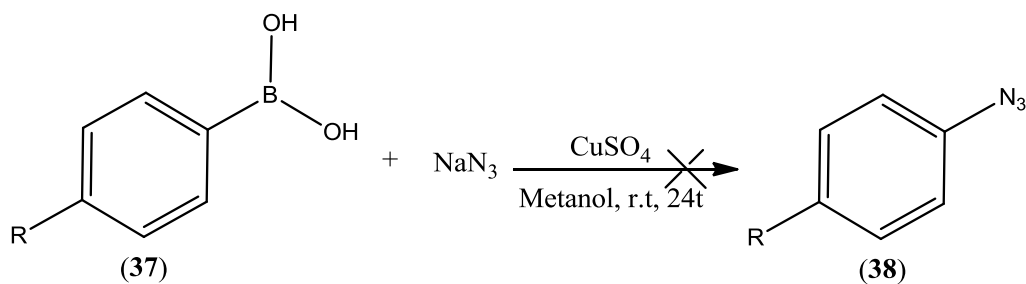
6.3 Forsøk på å syntetisere arylazider

I 2004 rapporterte Zhu og Ma en metode for dannelsen av forskjellige azider ved en kobberkatalysert aryl/vinyliodid – natriumazidkobling. På grunnlag av dette ble en one-pot metode utviklet for dannelsen av 1-aryl-1,2,3-triazoler. Reaksjonen var mellom arylhalider, natriumazider og terminale alkyner. Ulempen ved denne reaksjonen var at reaksjonstiden var lang (over natten), selv ved høye temperaturer (ca. 70°C). Dette skyldes den trege nukleofile aromatiske substitusjonen av arylhalider. Samtidig var denne reaksjonen følsom for vann og oksygen, og reaksjonen må da utføres under argon/nitrogen og under tørre betingelser.

Tao og medarbeidere rapporterte i 2007 en forbedret metoden av denne reaksjonen. I denne metoden ble det brukt arylborsyrer istedenfor arylhalider. Det ble rapportert at aziddannelsen foregikk raskere. Samtidig var denne metoden ufølsom for vann og oksygen^[53].

Det ble dermed bestemt at denne metoden skulle benyttes for triazoldannelsen. Siden dette var det siste trinnet for dannelsen av målmolekylet, ville det først bli laget arylazider og isolere disse forbindelsene. Dette ville da gi en bekreftelse at denne reaksjonsmetoden fungerte. Det ble bestemt at det skulle lages fem arylazider: benzylazid, *para*-tolyl-azid, *para*-metoksi-fenyl-azid, *para*-tert-fenyl-azid og *para*-fluor-fenyl-azid.

Å isolere disse forbindelsene førte til problemer. For alle fem reaksjonene viste TLC tegn på dannelsen av arylazider, men ¹H-NMR ga ikke den samme antydningen. Det viste seg at arylazider har ganske lavt kokepunkt. Disse forbindelsene har sannsynligvis forsvunnet under inndampingen sammen med løsemiddelet. I tillegg er arylazider ustabile, og selv om man klarer å isolere dem og holde dem kaldt og mørkt, vil de likevel dekomponere etter noen dager. Spesielt gjelder dette for arylazider med elektrondonerende substituenten. Det blir derfor vanskelig å isolere disse.



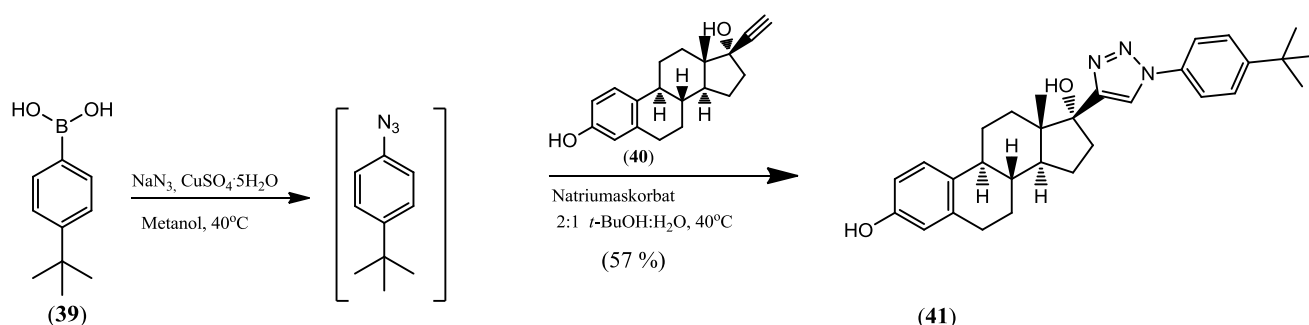
Skjema 6.15: Forsøk på å syntetisere arylazider

Siden TLC viste tegn til dannelsen av arylazider, ble det derfor bestemt å prøve one-pot metoden som er utviklet av Tao og medarbeidere. Opparbeidelsen for denne metoden var å bruke filtrering for å ”fange” triazolproduktene som ble dannet. Siden triazolproduktene var målmolekylene, og redsel for å miste en del av produktene ved denne opparbeidelsen, ble løsningen opparbeidet ved ekstraksjon med diklormetan, etterfulgt av vann.

Dette var ingen god ide. Denne endringen førte til dårlig utbytte. Disse triazolanalogene var vanskelig å rense ved kromatografi. Disse forbindelsene måtte renses to ganger, siden spekteret indikerte at forbindelsene ikke var rene. Dette ga da et totalt utbytte på 5-10 % etter kromatografi. Denne reaksjonsmetoden måtte dermed forbedres.

6.4 Forbedring av CuAAC prosedyren

Siden denne reaksjonen ikke var så vellykket, ble det gjort en testreaksjon med 17- β -etynyløstradiol og 4-*tert*-butyl-borsyre. Formålet ved denne reaksjonen var å optimalisere syntesen før nye mengder 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol ble benyttet.



Skjema 6.16: Syntese av 17- β -(1-*para-tert*-butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

Her er en oversikt over testreaksjonene som ble utført med 17- β -etynyløstradiol:

1. Ved den første testreaksjonen ble den molar mengden av natriumazid og av 4-*tert*-butylborsyre økt til henholdsvis 3,4 og 2,8 molar ekvivalenter. Dette ville resultere i et stort overskudd av arylazider og forhåpentligvis gi et bedre ubytte. Reaksjonstiden for dannelsen av arylazidet var ca 18 timer, mens triazoldannelsen var 30 timer. Allikevel viste TLC at det var noe 17- β -etynyløstradiol tilstedet under triazoldannelsen. Reaksjonen ga et utbytte på 12 %.
2. Siden det var noe startmaterial tilstedet under triazoldannelsen, ble det antydnet at økningen av CuSO_4 og natriumaskorbat ville løse dette problemet. CuSO_4 og

natriumaskorbat ble økt med 4 og 5 molare ekvivalenter. Reaksjonstiden var den samme testreaksjon 1. Utbyttet for reaksjonen ble 9 %. Det dårligere utbyttet kan skyldes at det store overskuddet av CuSO_4 fører til homo-kompleksing av startmaterialet.

3. I neste testreaksjon ble mengden CuSO_4 og natriumaskorbat endret tilbake som den var i testreaksjon 1. En hypotese for det dårlige utbyttet kunne skyldes dårlig løselighet av steroidet i vann. Det ble dermed gjort en endring der det ble brukt en blanding av *tert*-butanol:vann i 2:1 forhold. Utbyttet ble litt bedre og ble 14 %.
4. Selv om utbyttet ble litt bedre var ikke dette akseptabelt. Den lave utbyttet kunne skyldes opparbeidelsen. Det ble dermed gjort en endring ved denne delen av prosedyren. Det skulle brukes filtrasjon og ikke ekstraksjon under opparbeidelsen. Reaksjonstiden var den samme, og under opparbeidelsen ble det tilsatt 10 % vandig NH_4Cl og iskaldt vann. Dette førte til dannelse av bunnfall som var produktet. Bunnfallet ble samlet sammen ved filtrasjon. Reaksjonen ga et utbytte på 23 %.
5. Testreaksjon 4 ga et høyere utbytte enn de andre forsøkene, men allikevel viste TLC at ikke all startmateriale hadde blitt omdannet. Kobber er viktig i reaksjonen, og det ble trodd at dette kunne være feilen. For CuAAC som ble utviklet av Sharpless og medarbeidere, ble det brukt $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ^[60]. Det ble derfor i dette forsøket benyttet $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ istedenfor vannfritt CuSO_4 , ellers var det de samme betingelsene som i testreaksjon 4. Reaksjonen ga et utbytte på 35 %. Det kan ta lengre tid for vanfritt CuSO_4 til å bli omdannet til $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Pentahydrat formen er bedre løselig i reaksjonen enn anhydrat formen, og dette vil føre til en bedre katalytisk effekt.
6. I testreaksjon 5 viste TLC fortsatt tegn til at det fantes startmaterialet i reaksjonsblandingen. Et forsøk på å løse dette problemet var å erstatte *tert*-butanol med acetonitril. Muligens ville dette bedre løseligheten og gi et bedre utbytte. Reaksjonen ga et utbytte på 20 %. Det dårlige utbyttet kan skyldes at acetonitril koordinerer kobber. Dette vil da resultere i mindre mengder kobber som kan katalysere reaksjonen.
7. Siden testreaksjon 6 ga et dårligere utbytte enn testreaksjon 5, ble acetonitril byttet ut med *tert*-butanol. Felles for alle testreaksjonene som har blitt utført, er at TLC viser tegn på at ikke alt startmateriale har blitt omdannet. Reaksjonstiden kunne være problemet. Ved å la det stå lengre enn 32 timer kunne vært løsningen, men det er ønskelig å redusere reaksjonstiden. Reaksjonen skulle nå varmes opp til 40°C og ikke høyere. Ved for høy temperatur kunne denne reaksjonen ikke være så selektivt slik at

det blir dannet både 1,4- og 1,5-disubstituerte forbindelser i en termisk sykloaddisjonsreaksjon. Reaksjonstiden for arylaziddannelsen ble redusert betraktelig.

Aziddannelsen ble fullført i løpet av 3 timer sammenlignet med 24 timer.

Triazoldannelsen ble avsluttet etter 24 timer. TLC viste tegn til startmaterialet, men intensiteten på flekken var svak. Utbyttet for denne reaksjonen var 46 %.

8. Et fellesproblem for testreaksjonen var at det var vanskelig å rense dette ved kromatografi. Det ønskes å forbedre denne delen ved prosedyren. Bunnfallet som ble dannet under opparbeidelsen var sort. Dette kunne indikere på at det var kobber tilstede. Det ble dermed gjort et forsøk å fjerne dette fra bunnfallet. Det ble tilsatt EDTA slik at kobber dannet et EDTA-kobber kompleks, og kan kanskje gjøre det lettere å rense produktet. Dette var ingen god ide. Utbyttet ble redusert til 28 %.
9. I alle testreaksjonene hadde forbindelsen blitt rensed ved hjelp av kromatografi med heksan:EtOAc (18:1) som elueringsmiddel. Rensingen kunne kanskje bli bedre ved å endre dette med CH₂Cl₂:EtOAc (9:1). Reaksjonen ga et utbytte på 57 %. Dette var et akseptabelt utbyttet. Neste steg var å prøve den nye prosedyren med 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol.

I ¹H-NMR spekteret vil protoner fra aromater og heteroaromater være mellom 9,5-5 ppm. På dette spekteret finnes det 8 signaler ved dette området.

Det er en singlett ved 7,87 ppm som integrerer for 1H. Dette protonet er mest deshieldet i forhold til de andre protonene. Protonet på karbon 5 i triazolringen har 3 nitrogen atomer i nærheten. Dette vil føre til en sterk deshieldingseffekt og dette betyr at singletten kommer fra dette protonet.

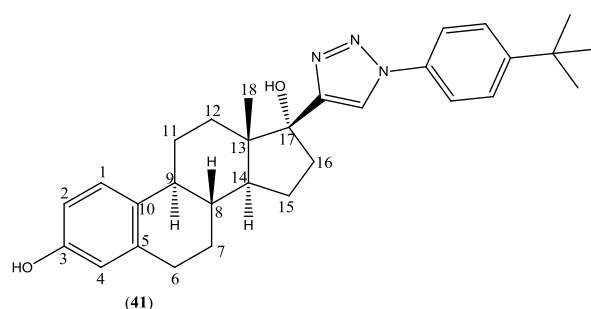
Ved 7,67-7,70 ppm og 7,52- 7,55 ppm dukker det opp to dubletter hvor hver av dem integrerer for 2H. Siden triazoler er en elektrontiltrekkendegruppe, så vil protonene i fenylingen være mer deshieldet enn protonene A-ringen på steroidstrukturen. Protonene på denne fenylingen vil også danne koblinger til hverandre, og dette vil føre til splitting av signalene i motsetning til protonene i A-ringen i steroidstrukturen. Disse to faktorene indikerer at de to dublettene kommer fra protonene i denne aromatiske ringen.

Denne disubstituerte fenylingen er symmetrisk og dette fører til at dubletten ved 7,67-7,70 ppm representerer protonene på karbon 2 og karbon 6, siden disse protonene er i *orto*-posisjonen i forhold til triazolringen. *Meta*-dirigerende grupper vil føre til at *orto*- og *para*-

posisjoner får redusert elektrontetthet i forhold til *meta*-posisjonen. Dubletten ved denne kjemisk shiftverdien har en koblingskonstant på 8,7 Hz og dette indikerte at det er *orto*-kobling tilstedet. Disse protonene har *orto*-koblinger med protonene på karbon 3 og 5.

Dubletten ved 7,52- 7,55 har en koblingskonstant på 8,7 Hz, og protonene på karbon 3 og karbon 5 danner som sagt *orto*-kobling med karbon 2 og 6. Dette betyr at dubletten kommer fra disse protonene.

Videre dukker det opp signaler som kommer fra A-ringen i steroidet. Ved 7,02-7,05 ppm og 6,57-6,61 ppm dukker det opp to dubletter hvor førstnevnte integrerer for 1H, mens den sistnevnte integrerer for 2H. Hydroksylgruppen er en aktiverende gruppe og vil føre til økt elektrontetthet på *orto/para*-posisjonene. Karbon 1 er i *meta*-posisjonen i forhold til hydroksylgruppen, mens karbon 2 og 4 er i *orto*-posisjonen. Karbon 1 vil dermed ha høyere kjemisk shiftverdi sammenlignet med de to andre karbonatomene. Dubletten ved 7,02-7,05 ppm vil dermed komme fra karbon 1, mens dubletten ved 6,57-6,61 ppm kommer fra karbon 2 og 4.



Figur 6.9: Struktur av forbindelse 41

Det er en singlett ved 1,36 ppm og ligger i det alifatiske området. Denne singletten integrerer for 9H. Dette er dermed en god indikasjon på at denne singletten representerer protonene i *tert*-butyl gruppen.

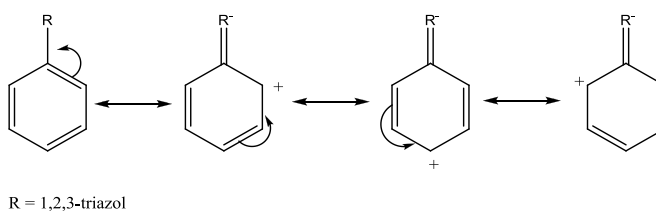
Singletten ved 1,07 ppm integrerer for 3H, og dette representerer protonene fra metylgruppen i 13-posisjonen.

De resterende signalene kommer fra de gjenværende protonene.

I ^{13}C -NMR spektret er det 12 signaler mellom 113,07-154,53 ppm, og disse representerer karbonatomene i aromatiske og triazolringene. Det er totalt to 14 karbonatomer i disse ringene, men fenylingen er symmetrisk. Det betyr at karbonatomene i 2- og 6-posisjonen på denne fenylingen vil gi et signal, og karbonatomene i 3- og 5-posisjon vil også gi et signal. De to signalene vil være mer intens enn de andre aromatiske karbonatomene. Dette skyldes at hver av de to signalene kommer fra to karbonatomer. De to signalene kommer ved 127,03 og

120,57 ppm. Karbonatomene 2 og 6 er i *orto*-posisjonen i forhold til triazolringen. De vil ha lavere elektrontetthet og få en deshieldingseffekt. Signalet for disse to karbonatomene vil derfor komme ved 127,03 ppm.

Karbonatomene 3 og 5 er på *meta* posisjon i forhold til triazolringen og vil ha større elektrontetthet enn karbonatomene ved *orto/para*-posisjonene. Signalet for disse karbonatomene kommer dermed fra 120,57 ppm.

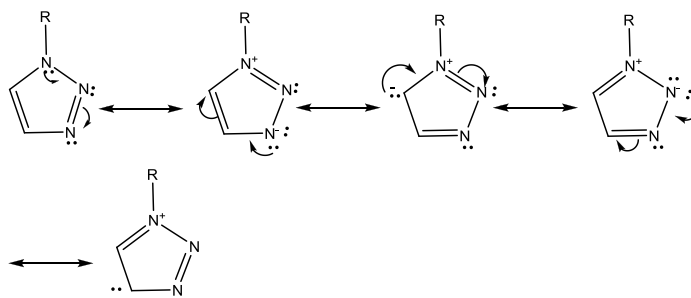


Skjema 6.17: Triazol er en elektrontiltrekkende gruppe og ved å se på resonansformene så vil denne gruppen føre til at *orto* og *para* posisjonen får positiv ladninger

Karbon 1 er bundet til nitrogenatomet i triazolringen. Dette fører til at dette karbonet vil være deshielded på grunn av elektronegativiteten. I tillegg til dette, vil dette karbonatomet også oppleve sterisk effekt av *tert*-butyl substituenten på karbon 4. Med disse to faktorene blir dette atomet veldig deshielded og antas å komme ved 152,56 ppm.

Karbon 4 på denne aromatiske ringen er i *para*-posisjonen i forhold til triazolringen. Karbon 4 på denne aromatiske ringen er bundet til *tert*-butyl substituenten. *Tert*-butylgruppen vil gi en steriskeffekt for karbon 4, og i tillegg til at dette karbonatomet er i *para*-posisjonen i forhold til triazolringen, vil dette karbonatomet oppleve deshieldingseffekt. Det antas at dette signalet kommer ved 138,59 ppm.

Triazolringen har to karbonatomer. Ved å se på resonans formene av triazolen vil N-1 atomet ha positiv ladning ved 4 av 5 resonansformene. Dette betyr at karbon 5 i triazolringen vil være mer deshielded enn karbon 4. Signalet for dette atomet kommer dermed ved 154,53 ppm.



Skjema 6.18: Resonansformene av 1.2.3-triazol

Samtidig ser vi at karbon 4 enten har en negativ ladning eller ligger ved atomer ved negativ ladning i 3 av 5 formene. Dette atomet ligger også ved hydroksylgruppe ved 17-posisjon. Dette fører til at dette atomet vil ha shieldingseffekt. Samtidig ligger dette karbonatomet ved hydroksylgruppen ved 17-posisjonen. Signalet ved 119,86 kommer fra dette atomet.

På A-ring i steroidstrukturen er karbon 3 bundet til hydroksylgruppen. Dette vil resultere i deshieldingeffekten og dette signalet kommer ved 153,81. Hydroksylgruppen er *orto/para*-dirigerende, og disse karbonatomene ved denne posisjonen vil dermed være shielded.

Karbonatomene i *orto*-posisjonen, karbon 2 og 4, er i nærheten av hydroksylgruppen og vil være mer shielded i forhold til karbon 10. Signalet ved 115,67 og 113,07 ppm vil komme fra karbon 2 og 4. Karbon 10 vil da komme ved 126,79 ppm.

Karbonatomene i *meta*-posisjon vil være mer deshielded i forhold til de andre karbonatomene på denne ringen. Karbonatomene 1 og 5 vil komme ved 134,99 og 132,90 ppm

Karbonatomer bundet til en alkoholgruppe kommer vanligvis mellom 50-70 ppm.

Karbonatomene i 17-posisjon er bundet til alkohol, men også til triazolgruppen. Begge disse gruppene vil gi deshieldingeffekt. Dette vil føre til at signalet på dette karbonatomet vil avvike noe fra litteraturen. Signalet ved 80,22 ppm representerer dette karbonatomet.

Tert-butylgruppen og metylgruppen er asykliske karbonatomer og vil normalt ha lavere ppm verdi i forhold til sykliske karbonatomer. *Tert*-butylgruppen er en substituent i en aromatisk ring og vil derfor avvike fra dette, og vil ha noe høyere ppm verdi. Det kvartenære karbonatomet i *tert*-butylgruppen vil oppleve induktiv effekt fra de andre karbonatomene i denne gruppen. Dette atomet vil dermed ha høyere ppm verdi enn de tre andre karbonatomene i denne gruppen. De tre CH₃ er ekvivalente og kommer i samme signal og dette signalet vil være mer intens enn de andre signalene. Dette signalet kommer ved 31,66 ppm og representerer disse tre karbonatomene. Det antas at kvartenære karbonatomet kommer ved 33,40 ppm.

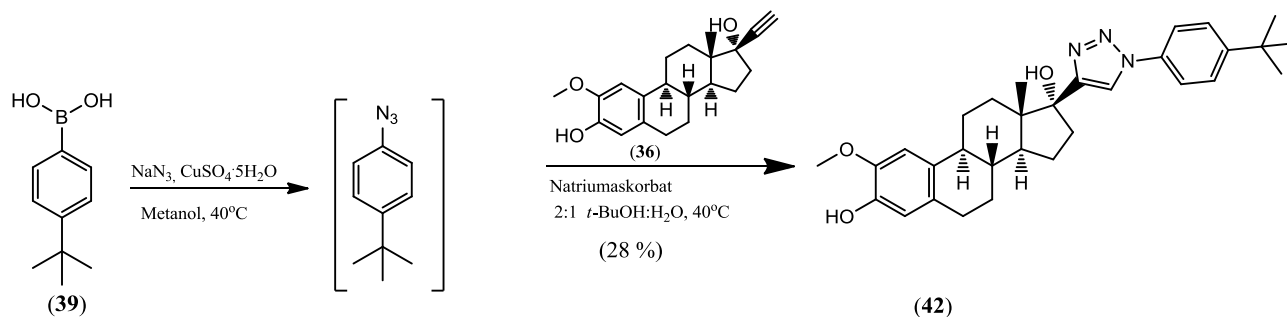
Metyl karbonet i 18-posisjonen kommer ved 14,65 ppm.

De resterende signalene representerer de resterende alifatiske karbonatomene i steroidstrukturen.

Smeltepunktet for denne forbindelse **41** var 152-156 °C.

6.5 Syntese av triazolderivatene av 2ME

6.5.1 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-*para-tert*-butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Skjema 6.19: Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-*para-tert*-butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

Aziddannelsen skjedde i løpet av 3 timer. Reaksjonsblandingen var først svart, og når aziddannelsen var ferdig, ble blandingen lysegrønn. Ved tilsetning av natriumaskorbat og forbindelse **36**, ble blandingen gul. Dette skyldes at Cu(II) ble redusert til Cu(I) som vil katalysere triazoldannelsen. Etter hvert ble blandingen mørkt lilla og reaksjonen ble da avsluttet.

Ubyttet for denne reaksjonen ble 28 %.

I ¹H-NMR spekteret vil protoner fra aromater og heteroaromater være mellom 9,5-5 ppm. På dette spekteret finnes det 8 signaler, men det er kun 7 aromatiske/heteroaromatiske protoner. Dette skyldes at det brede signalet ved 5,47 ppm representerer protonet på hydroksylgruppene.

Det er en singlett ved 7,87 ppm som integrerer for 1H. Dette protonet er mest deshieldet i forhold til de andre protonene. Protonet på karbon 5 i triazolringen har 3 nitrogenatomer i nærheten. Dette vil føre til en sterk deshieldingseffekt og dette betyr at singletten kommer fra dette protonet.

Ved 7,66-7,71 ppm og 7,48- 7,53 ppm dukker det opp to dubletter hvor hver av dem integrerer for 2H. Protonene i fenylingen vil være mer deshieldet enn protonene i A-ringene i steroidstrukturen, siden denne ringen er bundet til triazolringen. Protonene på fenylingen vil danne koblinger og dermed vil signalene splittes i motsetning til aromatiske protonene i

steroidet. Disse to faktorene indikerer at de to dublettene kommer fra de protonene i fenylingen.

Som det ble nevnt i forbindelse **41**, vil signalet ved 7,66-7,71 ppm representere protonene på karbon 2 og karbon 6, siden disse protonene er i *orto*-posisjonen i forhold til triazolringen og vil få en deshieldingseffekt. Dubletten ved denne shiftverdien har en koblingskonstant på 8,7 Hz og dette indikerte at det er en *orto*-kobling tilstede. De danner *orto*-kobling med karbon 3 og 5.

Karbon 3 og 5 er i *meta*-posisjonen i forhold til triazolringen. Dubletten ved 7,48- 7,53 har en koblingskonstant på 8,7 Hz, og protonene på karbon 3 og karbon 5 danner *orto* -kobling med karbon 2 og 6. Dette betyr at dubletten kommer fra disse protonene.

Det er en singlett ved 1,36 ppm og ligger i det alifatiske området. Denne singletten integrerer for 9H. Dette er dermed en god indikasjon på at denne singletten representerer protonene i *tert*-butylgruppen.

De gjenværende signalene har det samme signalmønsteret som observeres i spekteret til 2-metoksi-østron (**20**).

Shiftverdiene er derimot noe annerledes, og dette skyldes aryltriazolgruppen. Dette betyr at singletten ved 3,81-

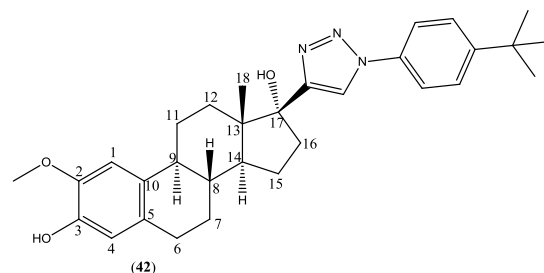
(3H) og 1,09 (3H) ppm representerer protonene i

metoksigruppen i 2-posisjon og metylgruppen i 17-

posisjon. De resterende signalene representerer de gjenværende protonene i steroidstrukturen.

I ^{13}C -NMR spekteret for forbindelsen **42** ligner veldig mye på spekteret til forbindelse **41**, men noen forandringer vil det være på grunn av metoksigruppen ved 2-posisjon i steroidstrukturen. Koblingsmønstrene ved denne ringen vil være annerledes i forhold til forbindelse **41**.

Både metoksigruppen og hydroksylgruppen er elektrondonerende grupper. Dette vil gjøre aromaten mer shielded og dette betyr kjemisk shiftverdiene vil være noe lavere enn det som ble sett i forbindelse **41**. Signalene ved 144,93 ppm og 143,82 vil komme fra karbon 2 og 3. Videre vil signalene 132,11 og 129,92 ppm komme fra karbonatomene 5 og 10 som begge er i *para*-posisjon i forhold til de to elektrondonerende gruppene. Karbonatomene i *orto*-posisjonen, nemlig karbon 1 og 4, vil dukke opp ved 114,98 og 108,45 ppm.



Figur 6.10: Struktur av forbindelse **42**

Karbonatomer i alkoksygrupper kommer mellom 40-50 ppm. Det er et signal ved 56,44 ppm og dette representerer metylgruppen i metoksigruppen i 2-posisjon. Dette avviker noe fra referanse området, og dette skyldes at denne gruppen er en substituent i en aromatisk ring.

Resten av spekteret er lik som i spekteret til forbindelse **41**.

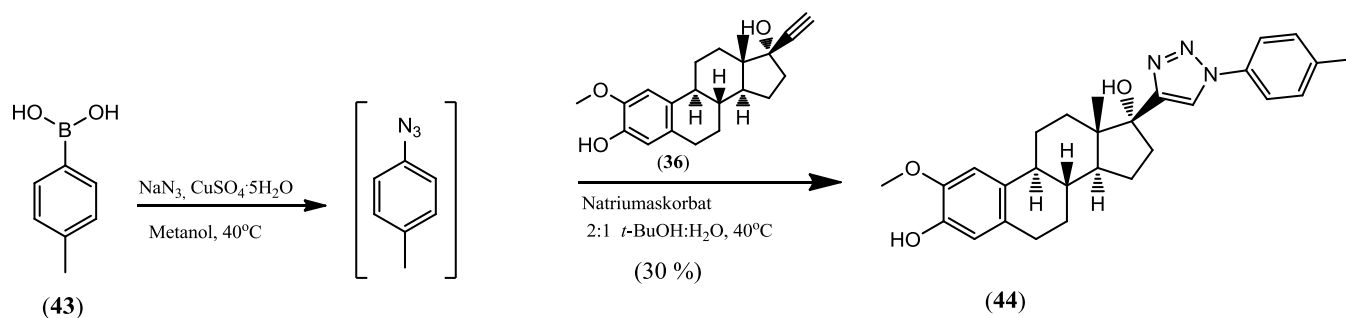
I IR-spekteret av forbindelse **42** observeres det topper ved 3538- og 1508 cm^{-1} . N=N topper kommer ved 1400-1450 cm^{-1} . Toppen ved 1508 cm^{-1} representerer N=N gruppen i triazolringen. Denne verdien avviker litt fra litteraturen, men det skyldes substituentene som finnes på triazolringen. Toppen ved 3538 cm^{-1} kommer fra hydroksylgruppene som finnes på forbindelsen.

På HPLC-analyse observeres det to topper. Det kan tyde på at det er to isomerer i forbindelsen, men verken ^1H -NMR og ^{13}C -NMR spekteret antyder dette.

Molekylvekten på forbindelse **42** er 501,66 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 501 og 502, og dette tilsvarer M^{+} og $\text{M}^{+} + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket, og samtidig at det ikke eksisterer to isomerer i forbindelsen.

Smeltepunktet for forbindelse **42** var 141-145 $^{\circ}\text{C}$.

6.5.2 Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-tolyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



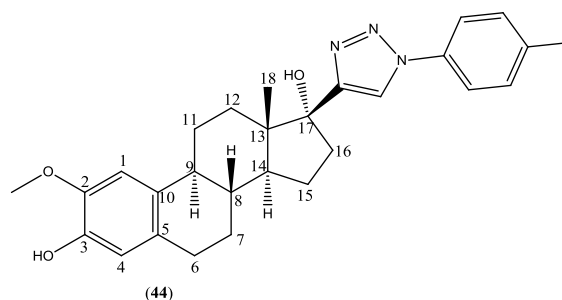
Skjema 6.20: Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-tolyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

De samme observasjonene som ble observert i forrige reaksjon, ble også observert i denne reaksjonen. Samme prosedyre som i forrige reaksjon ble også utført.

Ubyttet for denne reaksjonen ble 30 %.

^1H -NMR og ^{13}C -NMR spektroskopi for denne forbindelsen likner veldig mye på spektrene til forbindelse **42**. Forskjellen vil sees på proton- og karbonatomene i fenylingen. På ^1H -NMR spekteret vil dubletten med høyest shiftverdi komme fra protonene i karbon 2 og 6, mens den andre dubletten kommer fra karbon 3 og karbon 5. Sammenlignes dette spekteret med forbindelse **42**, så har disse dublettene noe lavere ppm verdi. Dette skyldes at metylgruppen er litt sterkere elektrondonerende gruppe en *tert*-butylgruppen. Samtidig har ikke metylgruppen den steriske faktoren.

Signalet for denne metylgruppen dukker opp ved 2,42 ppm og integrerer for 3H. Denne kjemisk shiftverdien ligger litt høyere enn det som er forventet for alifatiske protoner, men dette skyldes at metylgruppen er en substituent på fenylingen. Resten av spekteret er det samme som spekteret i forbindelse **42**.



Figur 6.11: Struktur av forbindelse **44**

Forskjellen mellom forbindelse **42** og forbindelse **44**, er substituenten på fenylingen. Som det har blitt nevnt tidligere, vil metylgruppen være en bedre elektrondonerende gruppen en *tert*-butylgruppe. Samtidig vil ikke den steriske effekten oppleves i denne forbindelsen. Disse faktorene vil føre til en mer shieldingeffekt på disse karbonatomene i ringen. Karbon 1 på denne ringen kommer ved 139,19 ppm, mens karbonatomene 2 og 6 kommer ved 130,63 ppm. Videre vil karbonatomene 3 og 5 komme ved 120,73 ppm. Karbon 4 vil ha et signal ved 135,20 ppm.

Metyl substituenten i aromatiske ringen vil ha en høyere ppm verdi enn metylgruppen i 18-posisjon, og det antas at signalet ved 21,37 ppm kommer fra dette karbonatomet.

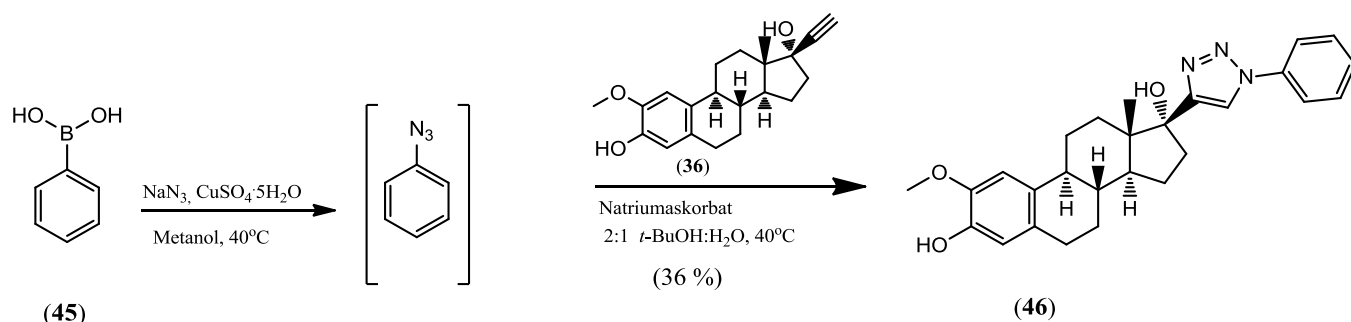
I IR-spekter sees topper ved 3402 cm^{-1} og 1517 cm^{-1} , og disse representerer hydroksylgruppene og N=N gruppen.

Molekylvekten på forbindelse **44** er 459,58 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 459 og 460, og dette tilsvarer M^{+} og $\text{M}^{+} + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Renheten av denne forbindelsen var 94 % basert på HPLC-analysen.

Smeltepunktet for forbindelse **44** var 142-144 °C.

6.5.3 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Skjema 6.22: Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

De samme observasjonene som ble observert i forrige reaksjon, ble også observert i denne reaksjonen. Samme prosedyre som i forrige reaksjon ble også utført.

Ubyttet for denne reaksjonen ble 36 %.

Ved 7,73-7,78 ppm observeres det en dublett som integrerer for 2H. Protonene på karbon 2 og karbon 6 på fenylingen vil være mer deshieldet i forhold til de andre protonene på denne ringen. Dette skyldes at disse protonene ligger i *orto*-posisjon. Dubletten kommer derfor fra disse protonene.

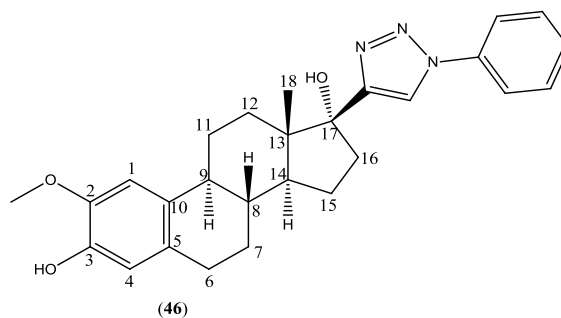
Koblingskonstanten er 9,6 Hz og dette indikerer på en *orto*-kobling med karbon 3 og 5, men disse protonene vil også danne *meta*-kobling med

protonet på karbon 4. Det skulle derfor vært dobbel dublett ved dette ppm område. Dette spekteret ble kjørt med 300 MHz, og denne frekvensen er sannsynlig ikke høy nok til at vi kan se dobbel dubletten.

Ved 7,35-7,57 ppm oppstår det multipllett. Denne multipletten integrerer for 3H og denne representerer for de 3 gjenværende protonene i denne fenylingen.

Resten av spekteret ligner på spekteret til forbindelse 44.

Denne forbindelsen har ikke en *para*-substituent på fenylingen. Dette vil dermed føre til at denne ringen vil kun oppleve deshieldingeffekten av triazolringen. Dette vil resultere endringer i dette spekteret. Generelt vil elektrontiltrekkende gruppe være *meta*-dirigerende, og



Figur 6.12: Struktur av forbindelse 46

dette skyldes de positive ladningene som dannes ved resonans formene. Dette resulterer i at karbonatomene i *orto*- og *para*-posisjonen vil være mer deshielded enn karbonatomene i *meta*-posisjonen. Karbonatomene i *orto*-posisjonen vil være mer deshielded enn karbonatomene i *para*-posisjonen, side disse karbonatomene er nærmere den elektrontiltrekkende gruppen. Dette betyr at karbonatomene 2 og 6 vil komme ved 120, 81 ppm, mens karbonatomene 3 og 5 kommer ved 130,16 ppm. Karbon 1 og 4 i denne ringen vil komme ved 137,47 og 129,09 ppm.

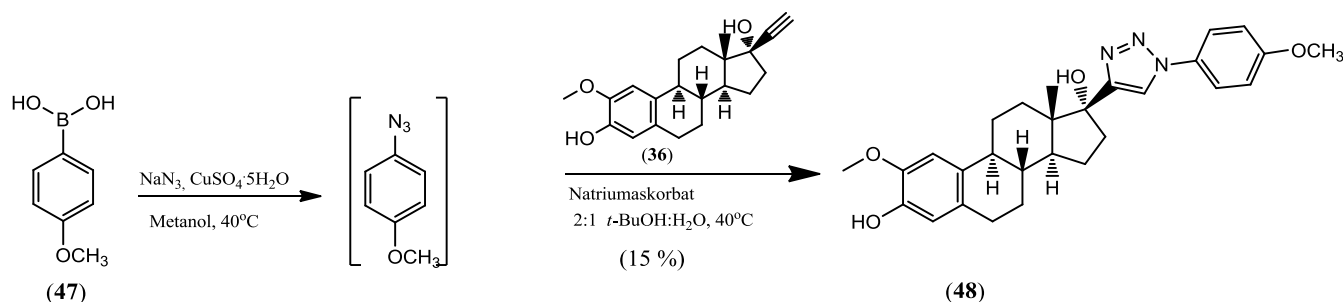
I IR-spekter sees topper ved 3538 cm^{-1} og 1506 cm^{-1} , og disse representerer hydroksylgruppene og N=N gruppen.

Renheten av forbindelsen var på 97 % basert på HPLC-analysen.

Molekylvekten på forbindelse **46** er 445,55 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 445 og 446, og dette tilsvarer M^{+} og $M^{+} + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Smeltepunktet for forbindelse **46** var på 141-145 °C.

6.5.4 Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-metoksi-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



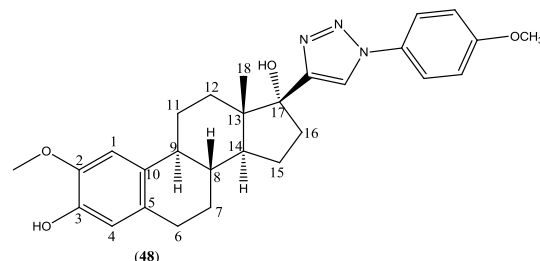
Skjema 6.24: Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-metoksi-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

Aziddannelsen skjedde i løpet av 1 time. Den korte reaksjonstiden kan skyldes at aarylborisyren har en elektrondonerende gruppe på seg. Dette vil gjøre forbindelsen **47** reaktiv.

Reaksjonsblandingen var først svart, og når aziddannelsen var ferdig ble blandingen lysegrønn. Ved tilsetning av natriumaskorbat og forbindelse **36**, ble blandingen gul. Dette skyldte at Cu(II) ble redusert til Cu(I) som vil katalysere triazoldannelsen. Etter hvert ble blandingen mørkt lilla og reaksjonen ble da avsluttet.

Utbyttet for denne reaksjonen ble 15 %. Arylazider med elektrondonerende grupper er ustabile og dette kan være forklaringen på den lave ubytten.

^1H -NMR spekteret for denne forbindelsen har det samme signalmønstret som spekteret til forbindelse **42**. I motsetning til forbindelse **42** inneholder denne forbindelsen en metoksigruppe og ikke *tert*-butylgruppe, som er bundet til aromatiske ringen ved triazolen. Det vil da være to forskjeller mellom disse spektrene, shiftverdiene for protonene som er bundet til aromaten ved triazolen og singletten til metoksigruppen.



Dublettene på dette spektret har en shiftverdi på 7,64-7,69 og 7,00-7,05 ppm. Disse dublettene har en lavere ppm-verdi enn dublettene hos forbindelse **42**. Dette skyldes at metoksigruppene er en mer elektrondonerende gruppe enn *tert*-butyl, og vil dermed gi en mer shieldingeffekt.

Protonene til de nevnte metoksigruppen kommer ved 3,87 ppm og denne singletten integrerer for 3H. Resten av spekteret ligner på spekteret til forbindelse **42**.

Som det har blitt nevnt tidligere, så er metoksigruppen en elektrondonerende gruppe. Dette vil føre til at de fleste karbonatomene på aromatiske ringen vil ha lavere ppm verdi i forhold til det som ble sett i forbindelse **42**. Karbon 4 på denne ringen er bundet til oksygenatomet i metoksigruppen, og samtidig er den ved en elektrotiltrakkende gruppe, triazol. Dette vil føre til at dette karbonatomet vil få deshieldingeffekt hos både oksygenatomat og triazolringen. Dette atomet vil ha et signal ved 160,15 ppm. Signalet til karbon 2 og 6 kommer ved 122,45 ppm, mens signalet til karbon 3 og 5 kommer ved 115,17 ppm. Karbon 1 vil komme ved 130,97 ppm. Resten av spekteret er de samme som spekteret til forbindelse **42**.

Karbonet for denne metoksigruppen dukker opp ved 56,04 ppm.

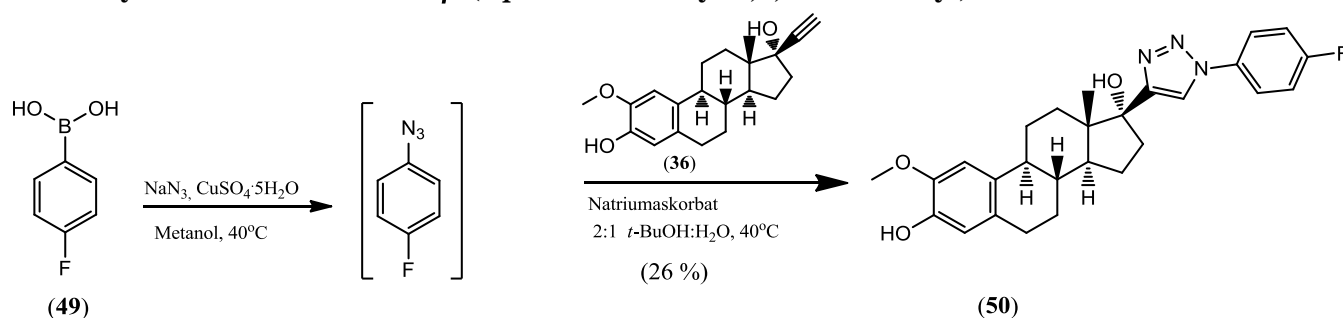
På IR-spekter sees topper ved 3538 cm^{-1} og 1501 cm^{-1} , og disse representerer hydroksylgruppene og N=N gruppen.

Renheten av forbindelsen var på 96 % basert på HPLC-analysen.

Molekylvekten på forbindelse **48** er 475,58 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 475 og 476, og dette tilsvarer M^{+} og $M^{+} + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Smeltepunktet for forbindelse **48** var 121-127 °C.

6.5.5 Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-fluor-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

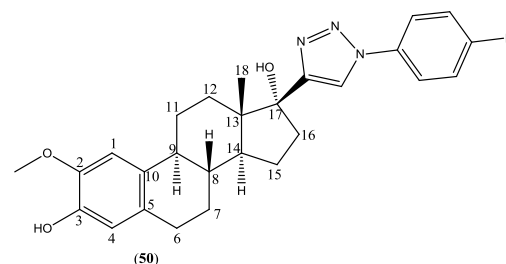


Skjema 6.26: Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-fluor-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

Aziddannelsen skjedde i løpet av 24 timer. Den lange reaksjonstiden kan skyldes at borsyren har en elektrontiltrekkende gruppe på seg. Reaksjonsblandingen var først svart, og når aziddannelsen var ferdig ble blandingen lysegrønn. Ved tilsetning av natriumaskorbat og forbindelse **36**, ble blandingen gul. Dette skyldte at Cu(II) ble redusert til Cu(I) som vil katalysere triazoldannelsen. Etter hvert ble blandingen mørkt lilla og reaksjonen ble da avsluttet.

Ubyttet for denne reaksjonen ble 26 %.

I $^1\text{H-NMR}$ spekteret vil fluor danne koblinger med protonene og dette vil føre til splitting av protonsignalene. Ved 7,54-7,74 ppm dukker det opp en multiplett som integrerer for 2H. Fluor er mer elektrontiltrekkende gruppe en triazolgruppen. Multipletten kommer da sannsynlig fra protonene i karbon 3 og karbon 5 i fenylingen.



Figur 6.14: Struktur av forbindelse **50**

Ved 7,47-7,54 ppm dukker det opp dobbel dubletter som integrerer for 2H. Dette kommer sannsynligvis fra protonene i karbon 2 og karbon 6.

Fluoratomet vil også føre til deshieldingeffekten og splitting av karbonsignalene på fenylingen. Signalene vil dermed forekomme som dubletter. Karbon 4 som er direkte bundet

til fluoratomet vil være mest deshielded og dubletten av dette atomet kommer ved 162,77 med koblingskonstant på 249,1 Hz. Som det har blitt nevnt tidligere vil en elektrontiltrekkende gruppe føre til at *orto*- og *para*-posisjon får δ^+ -ladning, og disse karbonatomene i de posisjonene vil være mer shielded i forhold til de andre karbonatomene. Karbon 3 og 5 er i *orto*-posisjon og karbon 1 er i *para*-posisjon

Karbon 1 er bundet til triazolringen og dette vil resultere i at dette karbonatomet vil være mer deshielded i forhold til karbon 3 og 5. Signalet for karbon 1 kommer dermed ved 133,74 ppm, mens dubletten for karbon 3 og 5 kommer ved 117,11 ppm med en koblingskonstant på 23,2 Hz.

Karbon 2 og 6 dukker opp ved 122,78 ppm med koblingskonstant på 8,6 Hz.

Resten av spekteret er det samme som spekteret til forbindelse **48**.

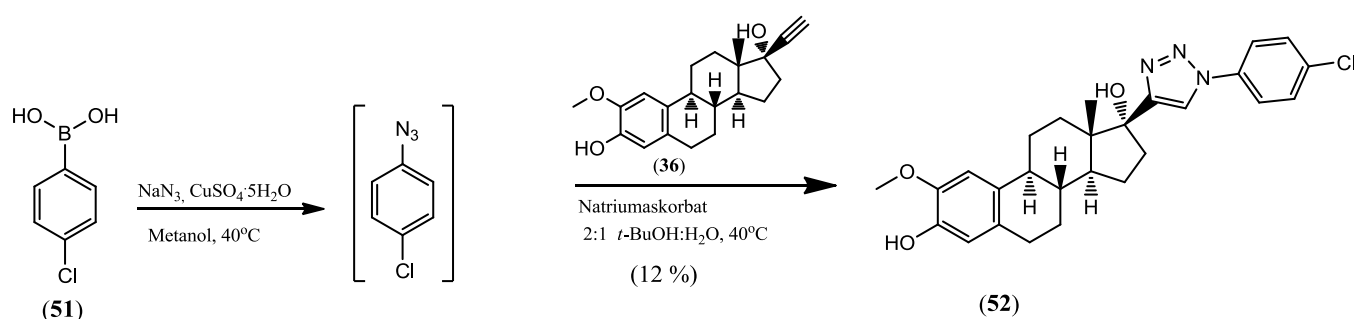
På IR-spekter sees topper ved 3538 cm^{-1} og 1516 cm^{-1} , og disse representerer hydroksylgruppene og N=N gruppen.

Renheten av forbindelsen var på 97 % basert på HPLC-analysen.

Molekylvekten på forbindelse **50** er 463,54 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 463 og 464, og dette tilsvarer M^+ og $M^+ + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Smeltepunktet for forbindelse **50** var 119-124 °C.

6.5.6 Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

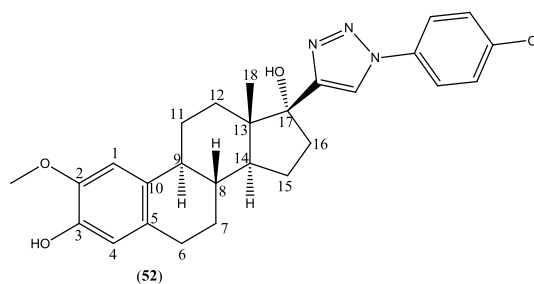


Skjema 6.27: Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

De samme observasjonene som ble observert i forrige reaksjon, ble også observert i denne reaksjonen. Samme prosedyre som i forrige reaksjon ble også utført.

Ubyttet for denne reaksjonen ble 12 %. Det ble benyttet 40 mg av forbindelse **36**, men i de andre klikk reaksjonene har det blitt brukt 80 mg. Konsentrasjonen var ikke den samme som i forrige reaksjonen. Dette kan være en forklaring på det lave utbytte.

I ^1H -NMR spekteret sees det samme signalmønster som forbindelse **50**, men kloratomet vil ikke føre til splitting av protonsignalene i fenylingen. Dubletten ved 7,69-7,73 ppm som er integrert for 2H og en koblingskonstant på 8,7 Hz, kommer fra protonene i karbon 3 og 5. Dubletten ved 7,46-7,51 ppm som integrerer for 2H og en koblingskonstant på 8,7 Hz, kommer fra protonene i karbon 2 og 6.



Figur 6.15: Struktur av forbindelse **52**

Resten av det spekteret er det samme som forbindelse **50**.

Denne reaksjonen ga et utbytte på 7 mg. Det ble forsøkt å ta ^{13}C -NMR spekter med en frekvens på 300 MHz og 4096 skann, men dette ble ikke vellykket. Derfor er det ingen karbonspekter for denne forbindelsen.

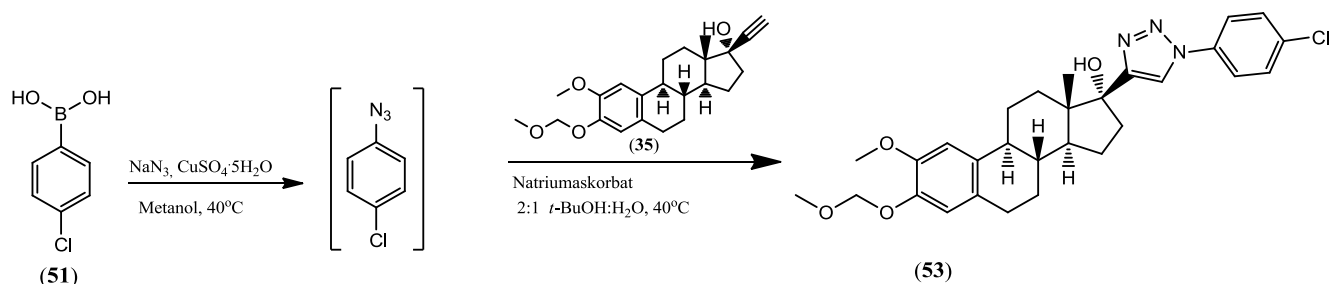
På IR-spekter sees topper ved 3538 cm^{-1} og 1501 cm^{-1} , og disse representerer hydroksylgruppene og N=N gruppen.

Renheten av forbindelsen var på 97 % basert på HPLC.

Molekylvekten på forbindelse **52** er 480,00 g/mol. På MS-spekteret observeres det signaler ved 479 og 481, og dette tilsvarer M^+ og $\text{M}^+ + 1$. Dette gir en ytterligere bekreftelse på at reaksjonen har vært vellykket

Smeltepunktet for forbindelse **52** var 125-128 °C.

6.5.7 Forsøk på å syntetisere 2-metoksi-3-metoksimetyl-17-β-(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

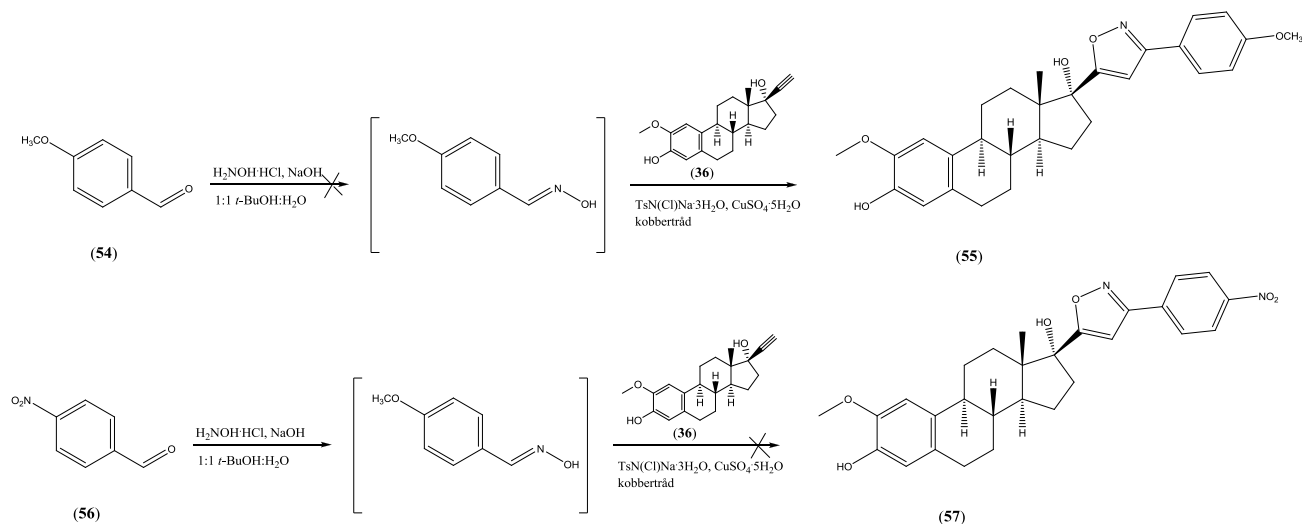


Skjema 6.28: Forsøk på å syntetisere 2-metoksi-3-metoksimetyl-17-β-(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol

Ved denne syntesen skulle det undersøkes om klikk-reaksjonen ga bedre utbytte dersom hydroksylgruppen var beskyttet med MOMCl. Dessverre ble ikke denne reaksjonen vellykket. TLC viste tegn til noe triazoldannelse, men det oppstod problemer ved rensingen av denne forbindelsen ved kromatografi. Det kan forklares med valget av elueringsmiddel og teknikken som ble utført ved kromatografi. Det ble valgt en elueringsmiddel $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc}$ (7:3) som var for polart, og dette skapte ikke en god separasjon av startmaterialet og produktet.

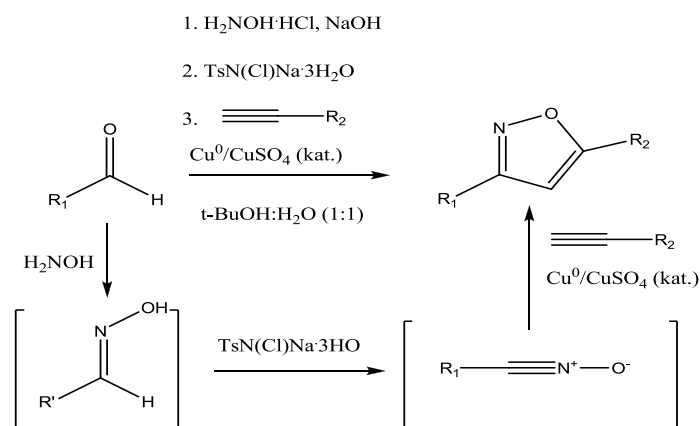
6.6 Forsøk på å syntetisere 3,5-disubstituerte isoksazoler

Det ble forsøkt å syntetisere to isoksazol analoger, 2-metoksi-17-β-(3-(4-nitrofenyl)-isoksazol-5-yl)-østradiol (**55**) og 2-metoksi-17-β-(3-(4-metoksifenyl)-isoksazol-5-yl)-østradiol (**56**). Dessverre ble ikke disse analogene dannet, da reaksjonene ikke var vellykket.



Skjema 6.29: Forsøk på å syntetisere 2-metoksi-17-β-(3-(4-metoksifenyl)-isoksazol-5-yl)-østradiol og 2-metoksi-17-β-(3-(4-nitrofenyl)-isoksazol-5-yl)-østradiol

Syntesen av 3,5-disubstituerte isoksazol analoger skulle utføres som en one-pot kobber(I)-katalysert syntese. Første trinn ved denne reaksjonen er dannelse av aldoksimet ved at aldehydet reagerer med hydroksylamin. Videre blir aldoksimet omdannet til den korresponderende nitril oksidet.



Skjema 6.30: Kobber (I) katalysert syntese av 3,5-disubstituerte isoksazoler

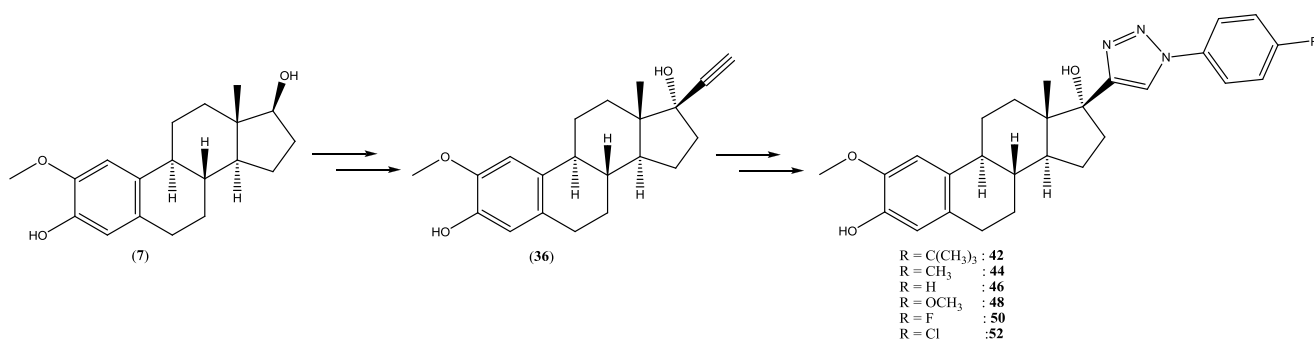
Da det ble forsøkt å syntetisere forbindelse **55** viste TLC ingen tegn til aldoksimdannelse. Dette ble forsøkt 3 ganger med samme resultat. Det mistenkes at anisaldehydet som ble benyttet var av dårlig kvalitet. Det ble tatt ^1H -NMR spekter av anis aldehydet, men dette spekteret avkreftet denne mistanken. Spekteret viste ingen tegn til oksidasjon av dette reagenset. Anisaldehydet er en oljeaktig løsning, og dette kan skape løselighetsproblemer med hydroksylamin reagenset. Dette kan hindre dannelsen av aldoksimet.

I forsøket på å syntetisere forbindelse **57**, ble aldoksimet dannet, men produktet uteble. Grunnen til dette kan tenkes seg at kloroamin-T trihydrat var av dårlig kvalitet. Dette ville dermed ikke føre til dannelse av nitril oksidet, som er forbindelsen som reagerer med alkynet og føre til dannelse av isoksazol.

En annen forklaring på at disse reaksjonene ikke var vellykket, er reaksjonsbetingelsene. Det kunne vært en mulighet å oppvarme blandingen.

7 Konklusjon

Fra 2-metoksiøstradiol (**7**) ble alkynet (**36**) fremstilt i 63 % utbytte over to-trinn. Fra **36** ble seks 1,4-disubstituerte 1,2,3-triazolanaloger fremstilt i en kobber(I) katalysert Huisgen sykloaddisjonsreaksjon. Utbytte for disse seks analogene: 2-metoksi-17- β -(1-*para-tert*-butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**42**), 2-metoksi-17- β -(1-*para*-tolyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**44**), 2-metoksi-17- β -(1-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**46**), 2-metoksi-17- β -(1-*para*-metoksi-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**48**), 2-metoksi-17- β -(1-*para*-fluor-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**50**) 2-metoksi-17- β -(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol (**52**), var i intervallet 12-36 %.



Skjema 7.1: Veien til dannelsen av triazolanalogene av 2ME

Disse seks analogene vil bli testet med hensyn på cytotoksisitet og antiangiogenetiske effekter.

8 Videre arbeid

Fremstillingen av alkynet **36** ved å bruke 2ME var vellykket, men 2ME er en dyr forbindelse. På Sigma Aldrich koster denne forbindelsen 150 kr/mg, mens 17- β -etynyløstradiol koster 1,19 kr/mg. Det er dermed ønskelig å bruke 17- β -etynyløstradiol som startmaterialet for fremstillingen av alkynet **36**. Rensingen av produktet i 1.trinn i denne metoden, skapte en del utfordringer. Optimalisering av denne delen er ønskelig.

Selv om 1,4-disubstituerte-1,2,3-triazol analoger ble syntetisert, var utbyttet moderat. Sannsynligvis skyldes det at noe av startmaterialene ikke reagerer med arylazidene. Det er mulig at reaksjonsbetingelsene ikke var optimalt. Mulig at reaksjonstiden må være lengre slik at utbyttet kan bli bedre. Sterisk hindring kan være en faktor. Det er mulig at arylazidene og alkynet **36** danner steriske hindringer for hverandre, slik at de blir vanskelig for dem å reagere. Det er ønskelig å forbedre denne reaksjonen.

9 Eksperimentelt

9.1 Materialer

Alle reagenser, reaktanter og løsemidler ble kjøpt fra Sigma-Aldrich og brukt uten videre rensing, med mindre annet er beskrevet.

9.2 Analyser

Synteseproduktene ble analysert ved hjelp av TLC, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, IR og HPLC.

9.2.1 Smeltepunktet

Det ble målt smeltepunkter for alle mellomprodukter og sluttprodukter, med mindre annet er beskrevet. Smeltepunktet ble målt i Stuart Scientific melting point apparatus SMP3.

9.2.2 Tynnsjikt-kromatografi (TLC)

TLC ble utført med TLC-aluminiumsplater med silikagel 60 F₂₅₄ (Merk). Sonene ble gjort synlige med UV-lys, 256 nm.

9.2.3 Kjernemagnetisk ressonanspektroskopi (NMR)

Det ble tatt ^1H -NMR og ^{13}C -NMR av alle mellomprodukter og sluttprodukter, med mindre annet er beskrevet. ^1H -NMR og ^{13}C -NMR ble tatt opp på enten Bruker DPX200 eller DPX300 instrument hvor den sistnevnte har en automatisk prøveholder. Prøvene ble løst i CDCl_3 og analysert ved romtemperatur. Spektrene ble bearbeidet i Mestrenova. Koblingskonstantene (J) blir rapportert i hertz (Hz), og kjemiskshiftverdi blir rapportert i parts per million (δ) i forhold til løsemiddelet.

Kjemisk shiftverdi for løsemidlene:

CDCl_3 :

^1H -NMR δ 7.24 (s)

^{13}C -NMR δ 77.23 (t)

9.2.4 Infrarødspektroskopi (IR)

IR-spekter ble tatt opp for 2ME analoger. Spektrene ble tatt opp på en Perkin Elmer Spektrum BX serier FT-IR spektrometer. Alle prøvene ble løst i CH_2Cl_2 og analyser ved romtemperatur. IR-spektrene ble bearbeidet i Spectrum (software)

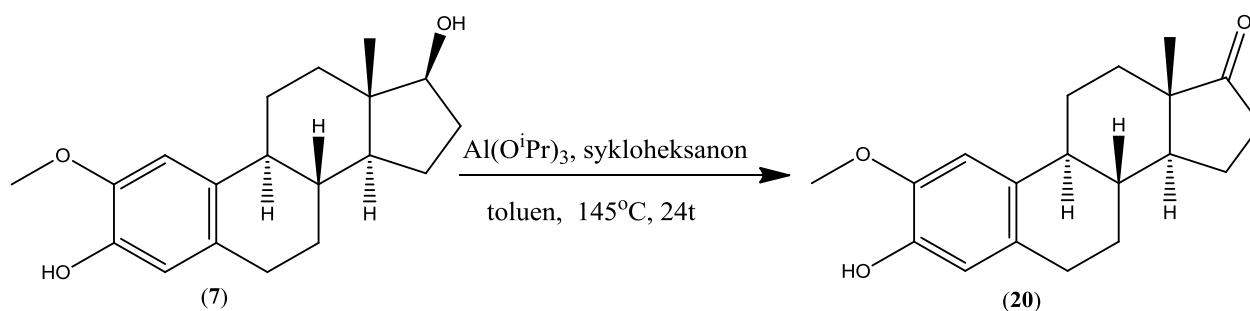
9.2.5 Væskeskromatografi (HPLC)

Det ble utført HPLC-analyse på 2ME triazolanalogene. Det ble brukt Agilent technologies 1200 series med kolonne Zorbax SB C-18 RRHT. Alle prøvene ble løst i CH_3CN slik at konsentrasjonen var 1 mg/ml. Mobilfasen som ble brukt var: A: H_2O : CH_3CN (95:5), B: CH_3CN , C: MeOH.

9.2.6 Massespektroskopi (MS)

Det ble tatt MS-spekter på 2ME analoger. Dette ble utført av Kjemisk institutt i Universitetet i Oslo, hvor det ble brukt instrumentet Micromass Prospec Q.

9.3 Syntese av 2-metoksiøstron



Referanse

Edsall, Allison B., Mohanakrishnan, Arasambattu K., Yang, Donglai, Fanwick, Philip E., Hamel, Ernest, Hanson, Arthur D., Agoston, Gregory E., Cushman, Mark, *J. Med. Chem* 2004, **47**(21):5126-5139.

Fremgangsmåte

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 7	4,63	1	1,40 g	-	302	-	-
Toluen	-	-	-	56	92,	0,87	110,6
Al(O ⁱ Pr) ₃	23,2	5	4,74 g	-	204	-	-
Sykloheksanol	184,2	40	-	19	98	0,95	155,65

Forbindelse **7** (1,40 g, 4,6 mmol) ble tilsatt i en tørr 250 ml 2-halset rundkolbe som var koblet med en 25 ml Dean-Stark fanger. Toluen (56 ml) ble tilsatt slik at startmaterialet ble løst.

Al(OⁱPr)₃ (4,74 g, 23,2 mmol) og sykloheksanon (19 ml, 184,2 mmol) til

reaksjonsblandingen. Reaksjonsblandingen ble varmet opp ved reflux (140-145 °C) under nitrogen. Reaksjonen ble refluxert i ca. 24 timer. Da TLC ikke lengre viste noen tegn til

startmaterialet ble reaksjonen avkjølt til romtemperatur. Blandingen hadde nå gule klumper

som kommer fra saltdannelse. Det ble så tilsatt H₂O (100 ml) og 1M HCl (45 ml). Blandingen ble overført til et begerglass. Det ble tilsatt mer 1M HCl inntil alt fast materiale var løst.

Blandingen ble videre ekstrahert med EtOAc (3 x 100 ml). De kombinerte organiske fasene ble overført til et begerglass. Mettet NaHCO₃ (20 ml) ble tilsatt forsiktig til blandingen.

Blandingen ble rørt til det var ingen tegn til gassutvikling og ekstrahert. Organiske fasen ble vasket med mettet NaCl-løsning (40 ml) og tørket over MgSO₄. Blandingen ble deretter dampet under redusert trykk. Dette resulterte i et oransje oljeaktig råprodukt.

Råproduktet ble destillert under vakuum inntil nesten all løsningen var borte. Den resterende løsningen ble renses ved kolonnekromatografi (heksan:EtOAc 10:1; R_f = 0,43).

Data:

Smeltepunkt: 159-165 °C

Utbytte: 65 %

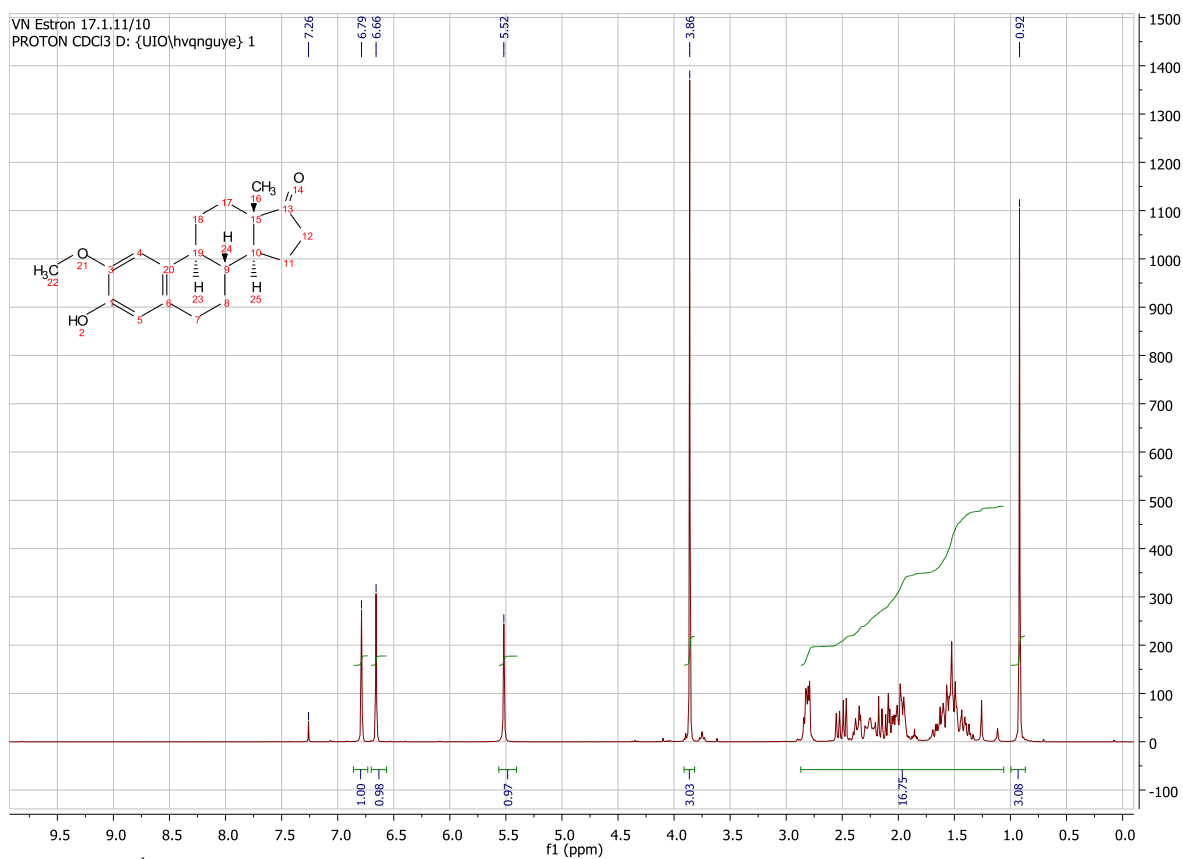
Produkt: Hvitt fast stoff

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.79 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.52 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.87 – 1.06 (m, 17H), 0.92 (s, 3H).

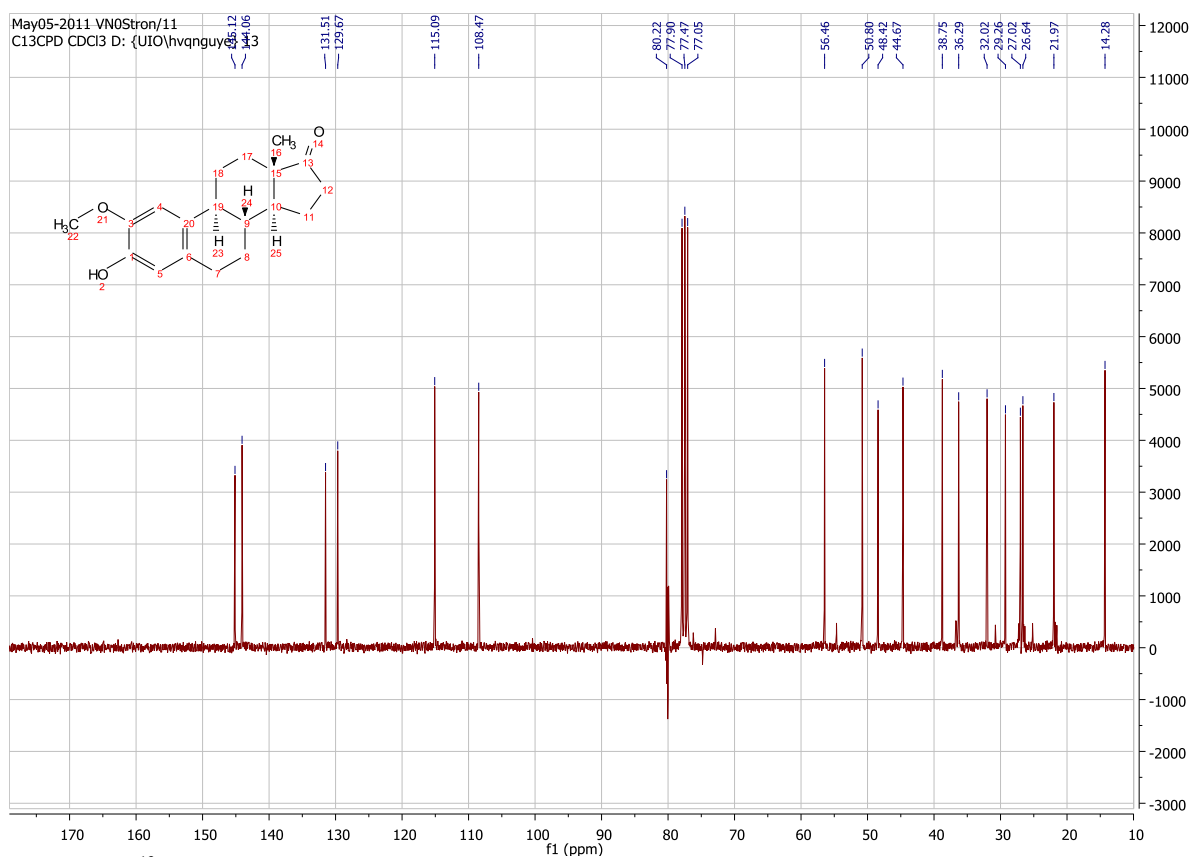
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 145.12, 144.06, 131.51, 129.67, 115.09, 108.47, 56.46, 50.80, 48.42, 44.67, 38.75, 36.29, 32.02, 29.26, 27.02, 26.64, 21.97, 14.28.

IR(Utvalgte topper): 1736 cm^{-1} , 3538 cm^{-1}

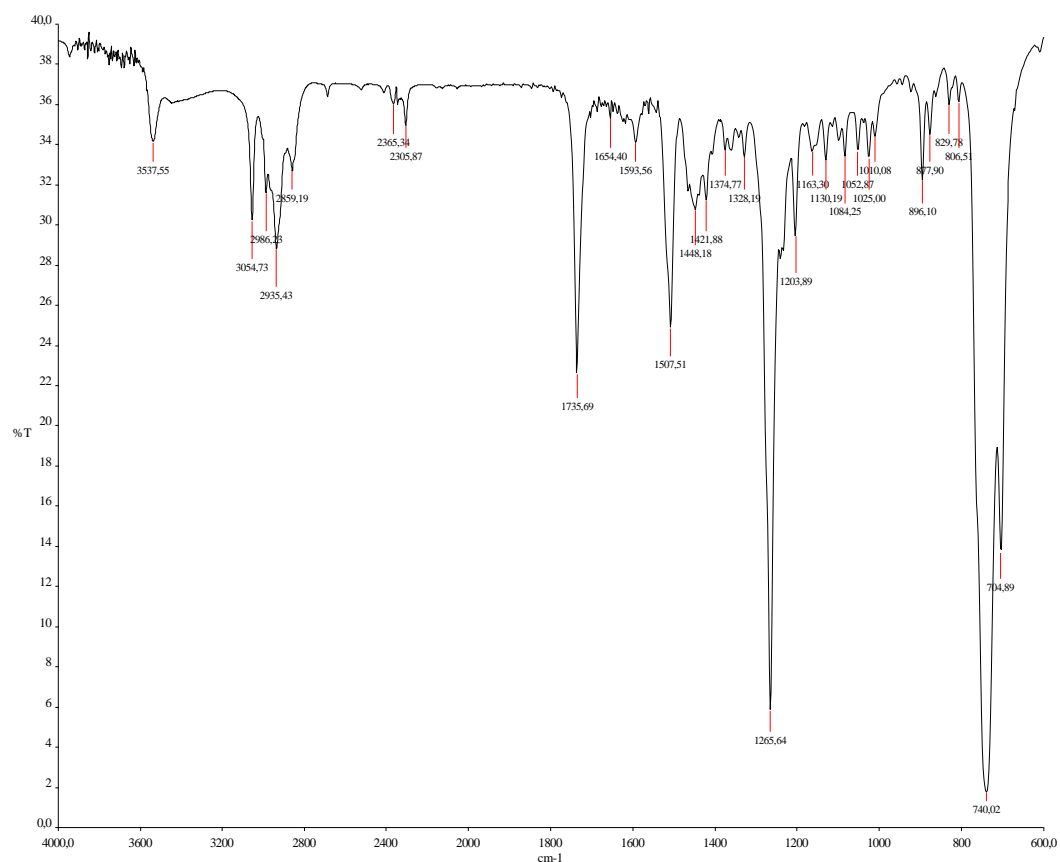
MS (EI): m/z = 300 ($\text{M}^{\cdot+}$), 301 ($\text{M}^{\cdot+}+1$)



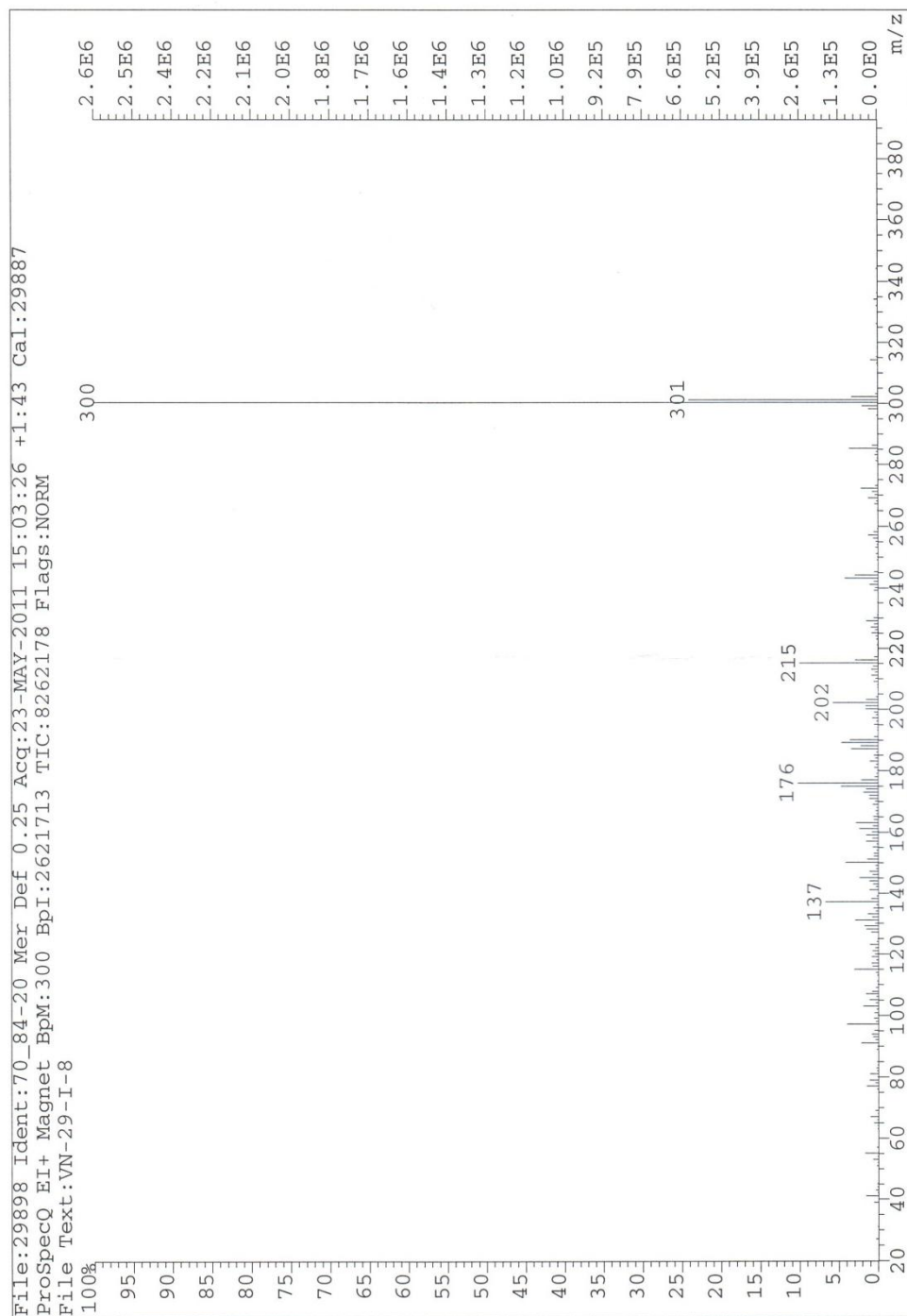
Spekter 9.1: ^1H -NMR spekter av forbindelse 20



Spekter 9.2: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 20

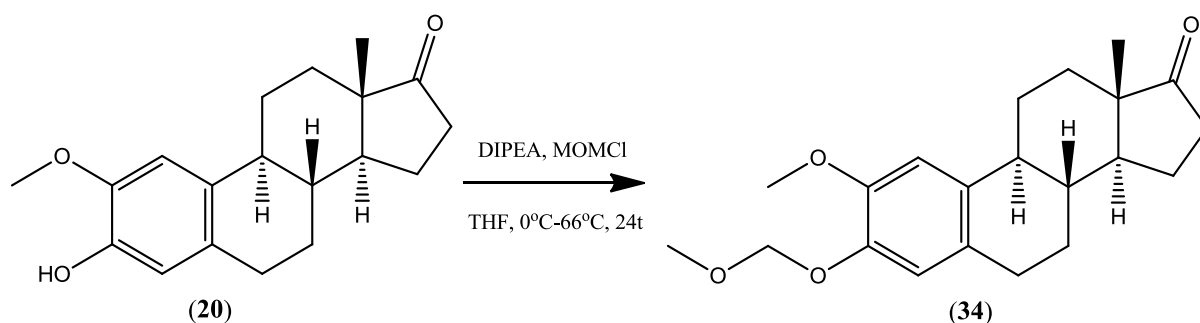


Spekter 9.3: IR-spekter av forbindelse 20



Spekter 9.4: MS-spekter av forbindelse 20

9.4 Syntese 2-metoksi-3-O-metoksimetyl-østron



Referanse:

Edsall, Allison B., Mohanakrishnan, Arasambattu K., Yang, Donglai, Fanwick, Philip E., Hamel, Ernest, Hanson, Arthur D., Agoston, Gregory E., Cushman, Mark, *J. Med. Chem* 2004, **47**(21):5126-5139.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 20	1,7	1	50 mg	-	300	-	-
DIPEA	4,2	2,5	-	17	129	0,74	127
MOMCl	4,2	2,5	-	0,32	81	1,06	57
THF	-	-	-	5	72	0,89	66

Forbindelse **20** (0,50 g, 1,7 mmol) og tørr THF (5 ml) ble blandet i en 50 ml rundkolbe. DIPEA (0,72 ml, 4,2 mmol) ble så tilsatt til blandingen. Blandingen ble så rørt ved 0 °C under nitrogen i 30 min. MOMCl (0,32 ml, 4,2 mmol) ble så tilsatt dråpevis til blandingen ved 0 °C. Blandingen ble videre varmet opp til romtemperatur i 1 time og deretter ble den refluksert (70-75 °C) i ca. 24 timer under nitrogen. Da TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet ble reaksjonen avkjølt til romtemperatur. Etter avkjølingen ble H₂O (15 ml) og EtOAc (15 ml) tilsatt til blandingen og dette ble ekstrahert. Vannfasen ble videre ekstrahert med EtOAc (2 x 10 ml). De kombinerte organiske fasene ble ekstrahert med 10 % eddiksyre (2 x 10 ml). Organiske fasen ble overført til begerglass og mettet NaHCO₃ løsning (10 ml) ble tilsatt. Blandingen ble rørt inntil ingen tegn til gassutvikling. Denne blandingen ble vasket med mettet NaCl-løsning (15 ml) og tørket over MgSO₄. Blandingen ble dampet under redusert trykk. Dette førte til et oransje oljeaktig råprodukt, som senere ble rensert ved hjelp av kolonnekromatografi (heksan:EtOAc 9:3, R_f = 0,53).

Data:

Smeltepunkt: 145-150 °C

Utbyttet: 63 %

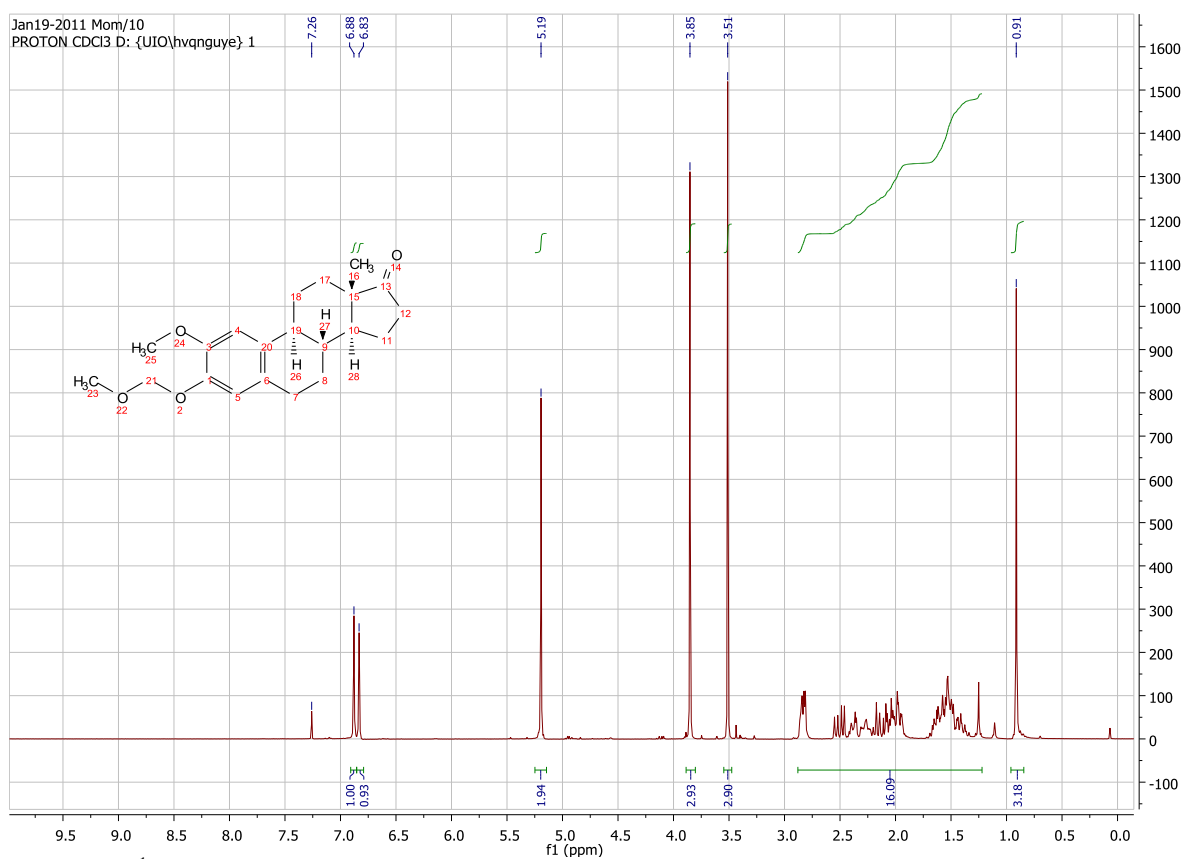
Produkt: Hvitt fast stoff

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.88 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 2.88 – 1.22 (m, 16H), 0.91 (s, 3H).

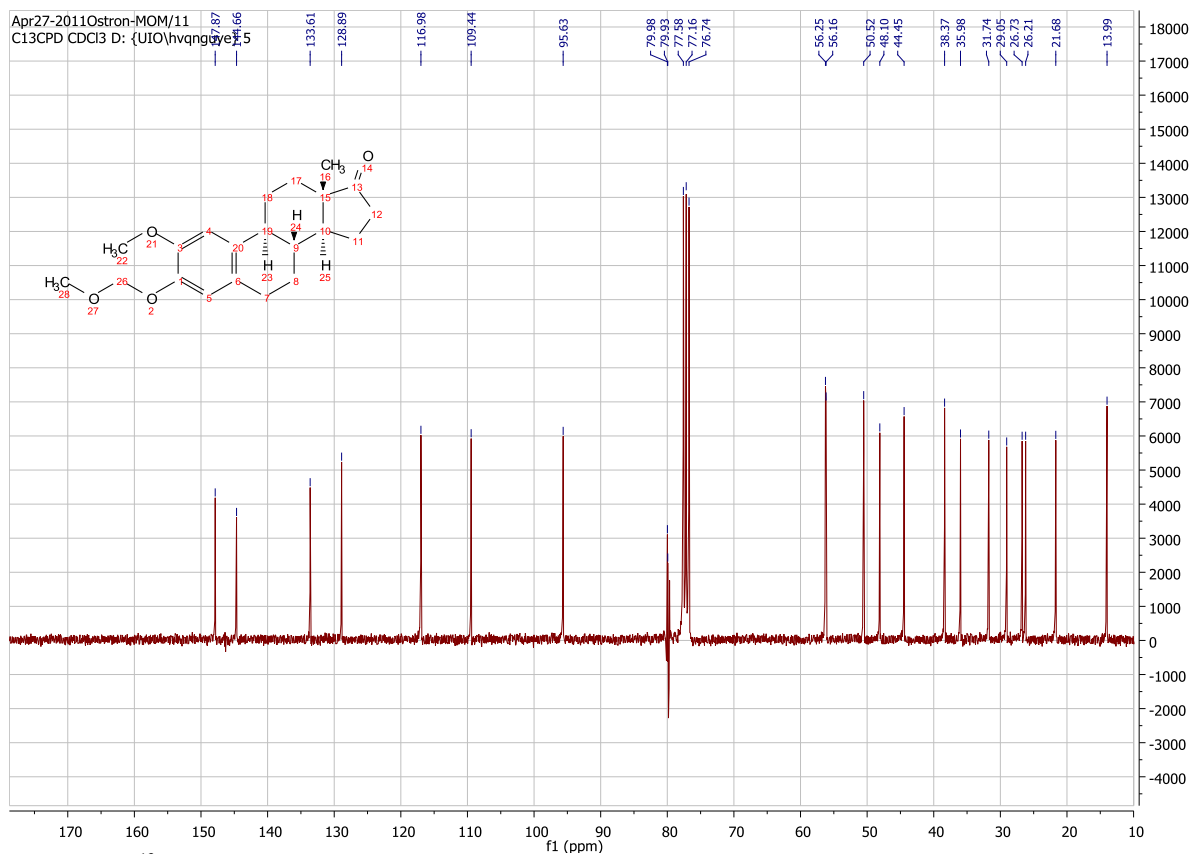
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 147.87, 144.66, 133.61, 128.89, 116.98, 109.44, 95.63, 56.25, 56.16, 50.52, 48.10, 44.45, 38.37, 35.98, 31.74, 29.05, 26.73, 26.21, 21.68, 13.99

IR (Utvalgte topper): 1736 cm^{-1}

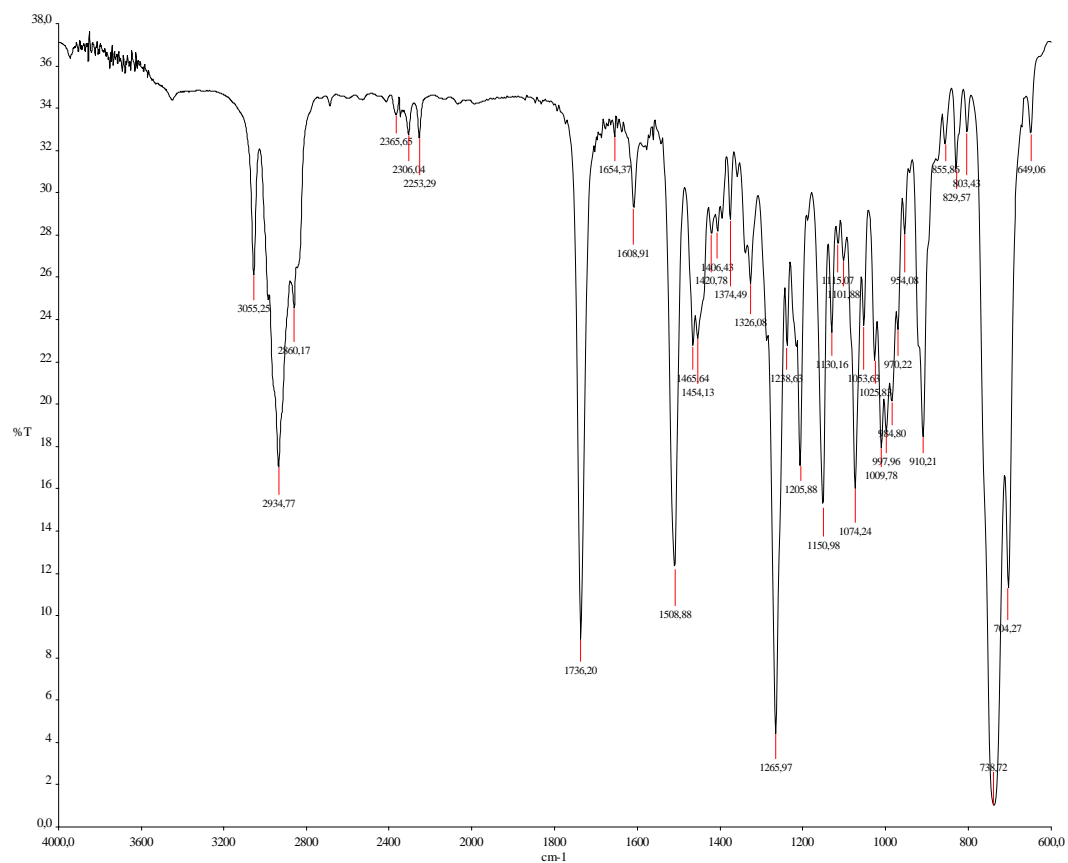
MS (EI): $m/z = 344$ (M^+), 345 ($\text{M}^+ + 1$)



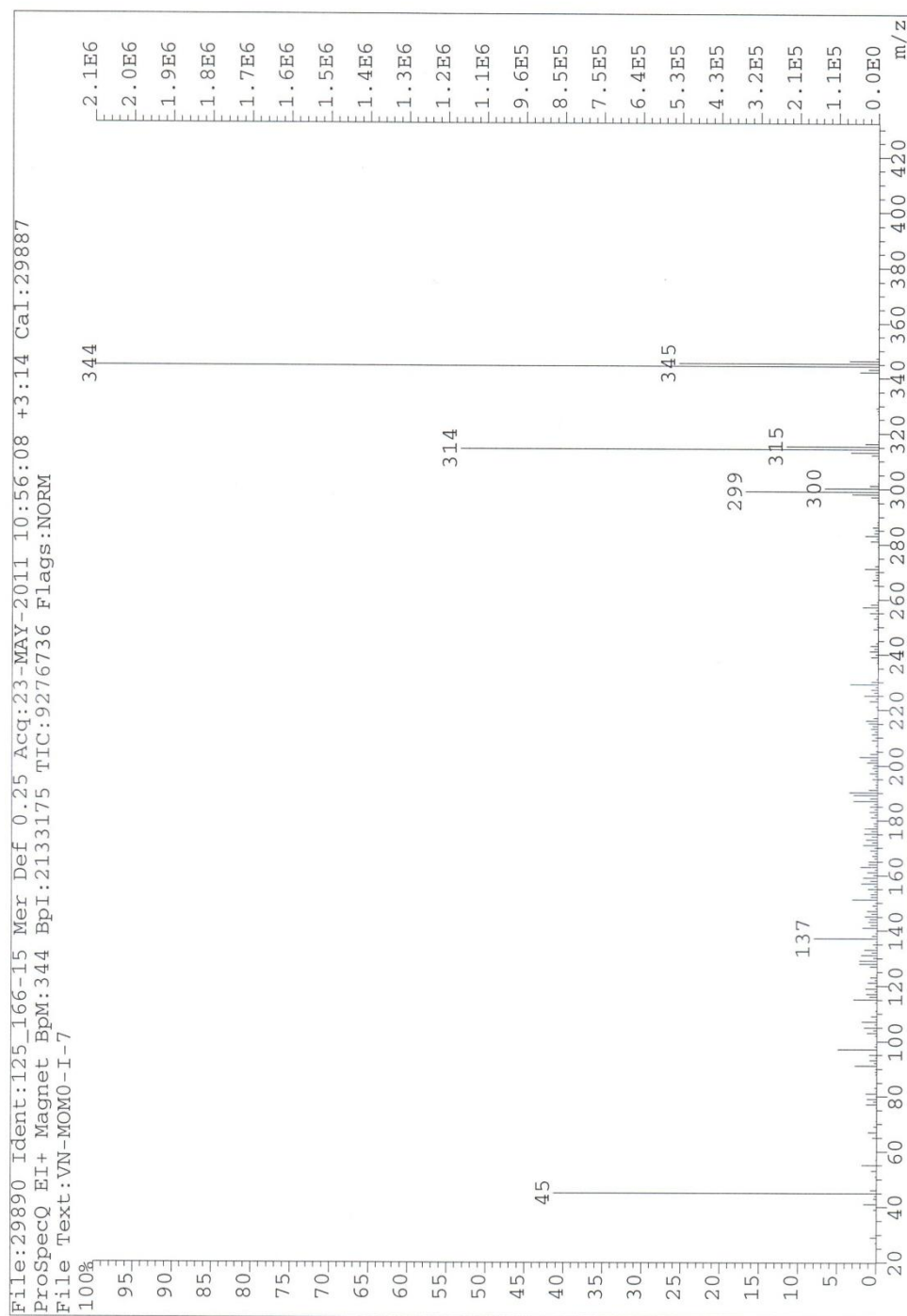
Spekter 9.5: ^1H -NMR spekter av forbindelse **34**



Spekter 9.6: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 34

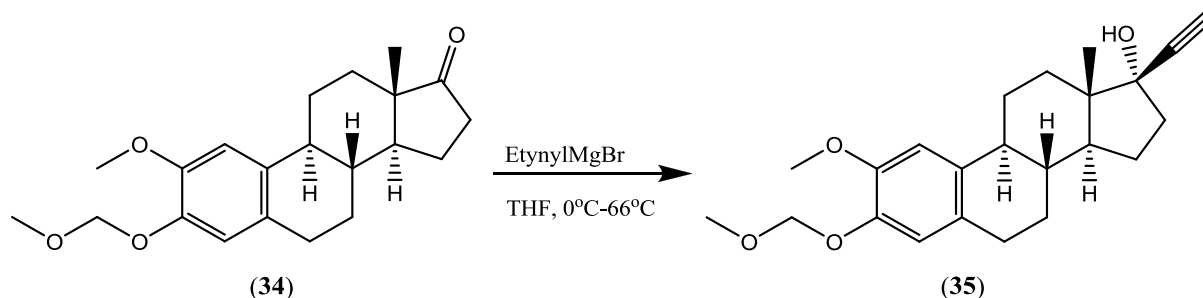


Spekter 9.7: IR-spekter av forbindelse 34



Spekter 9.8: MS-spekter av forbindelse **34**

9.5 Syntese av 2-metoksi-3-O-metoksimetyl-17-β-etynyløstradiol



Referanse

Edsall, Allison B., Mohanakrishnan, Arasambattu K., Yang, Donglai, Fanwick, Philip E., Hamel, Ernest, Hanson, Arthur D., Agoston, Gregory E., Cushman, Mark, *J. Med. Chem* 2004, **47**(21):5126-5139.

Fremgangsmåte

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 34	1	1	344 mg	-	344	-	-
0,5M etynylMgBr i THF	5	5	-	10	-	0,94	66
THF	-	-	-	10	72	0,89	66

En 0,5 M løsning av etynylmagnesiumbromid i THF (10 ml, 5 mmol) ble tilsatt i en 50 ml rundkolbe under nitrogen. Løsningen ble avkjølt til 0 °C. Etter avkjølingen ble en løsning av forbindelse **34** (344 mg, 1 mmol) i THF (10 ml) tilsatt dråpevis til blandingen. Reaksjonen ble rørt ved romtemperatur i ca. 20 timer. Da TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet, ble reaksjonen avsluttet ved å tilsette 2M NH₄Cl løsning (20 ml). Blandingen ble så videre ekstrahert med EtOAc (3 x 30 ml). De kombinerte organiske fasene ble vasket med vann (20 ml) og tørket over MgSO₄. Blandingen ble dampet under redusert trykk. Dette resulterte i et oransje fast stoff.

Dette ble rensert ved hjelp av kolonnekromatografi (heksan:EtOAc 9:2, R_f: 0,35)

Data:

Smeltepunkt: 120-124 °C

Utbytte: 57 %

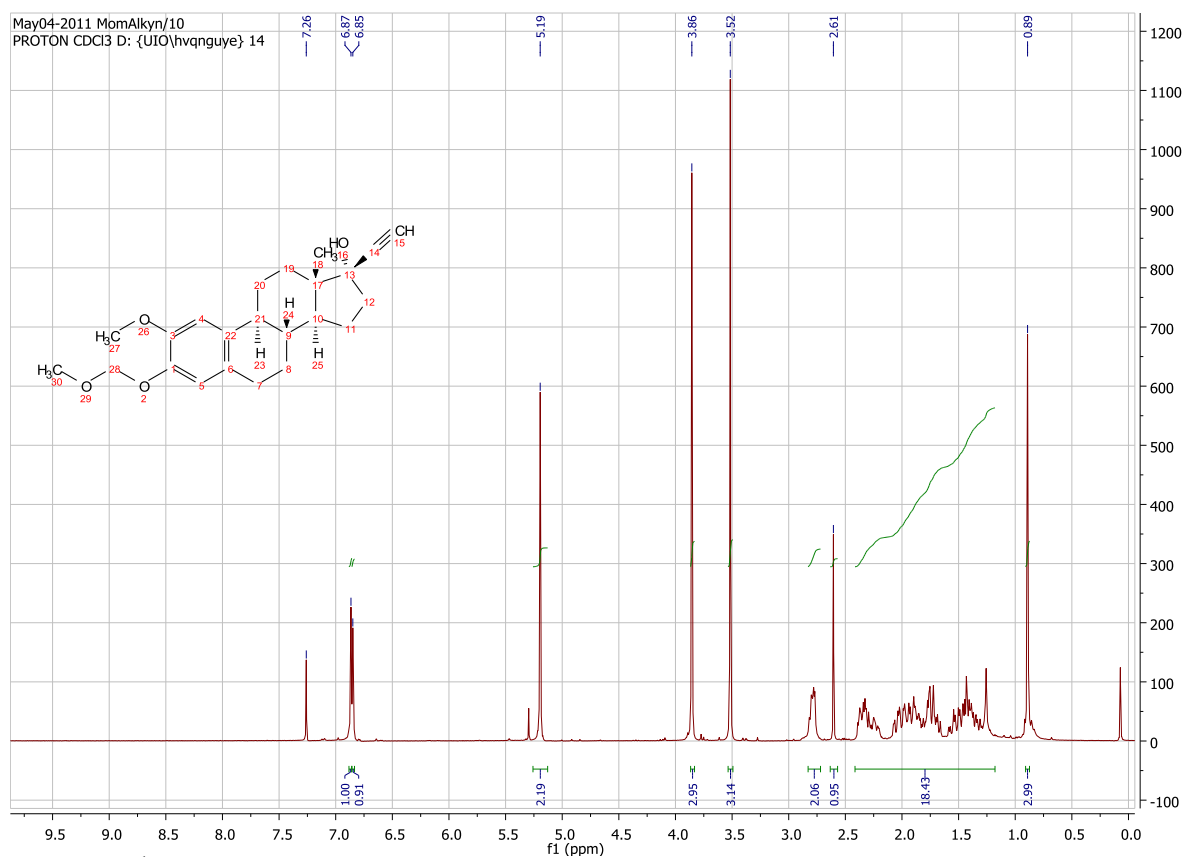
Produkt: Hvitt fast stoff

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.87 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 2.79 (2H), 2.61 (s, 1H), 2.41 – 1.18 (m, 18H), 0.89 (s, 3H).

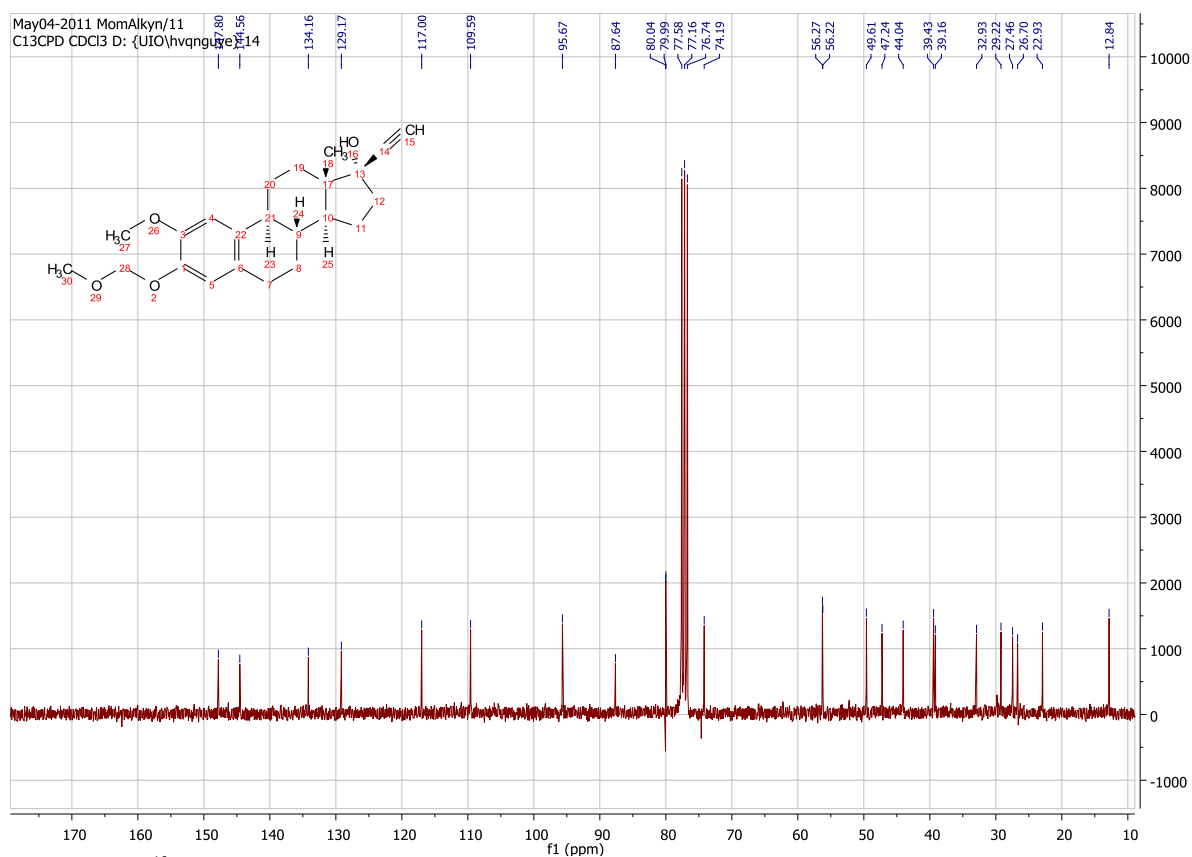
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 147.80, 144.56, 134.16, 129.17, 117.00, 109.59, 95.67, 87.64, 74.19, 56.27, 56.22, 49.61, 47.24, 44.04, 39.49, 39.30, 32.93, 29.22, 27.46, 26.70, 22.93, 12.84.

IR (Utvalgte topper): 2306 cm⁻¹

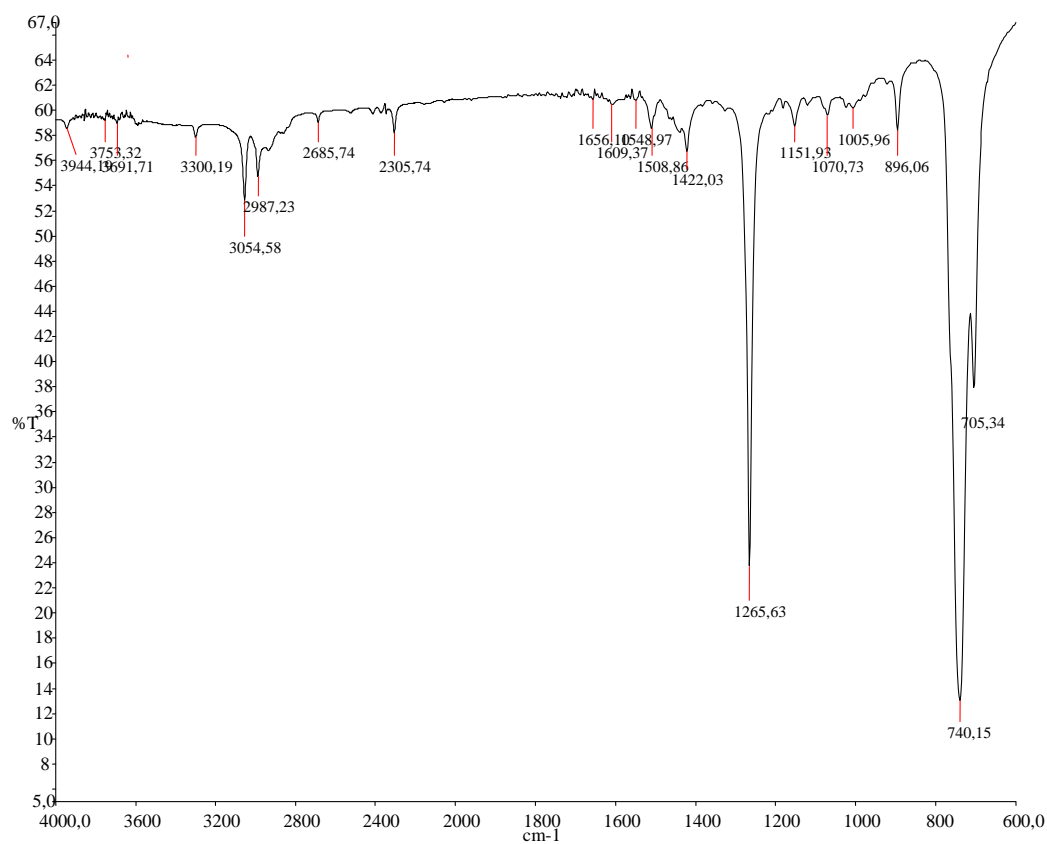
MS (EI): m/z = 370 (M⁺), 371 (M⁺+1)



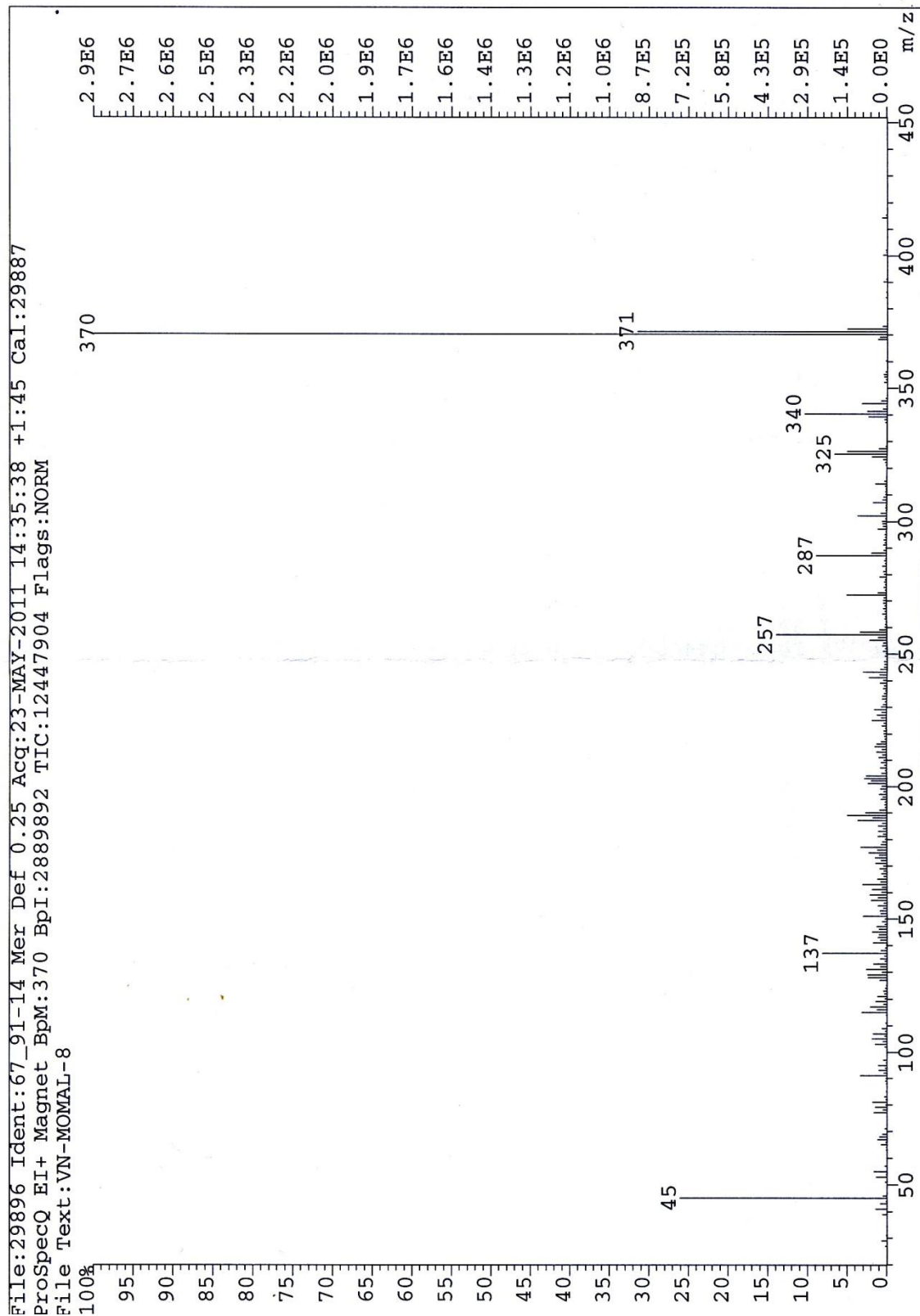
Spekter 9.9: ¹H-NMR spekter av forbindelse **35**



Spekter 9.10: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 35

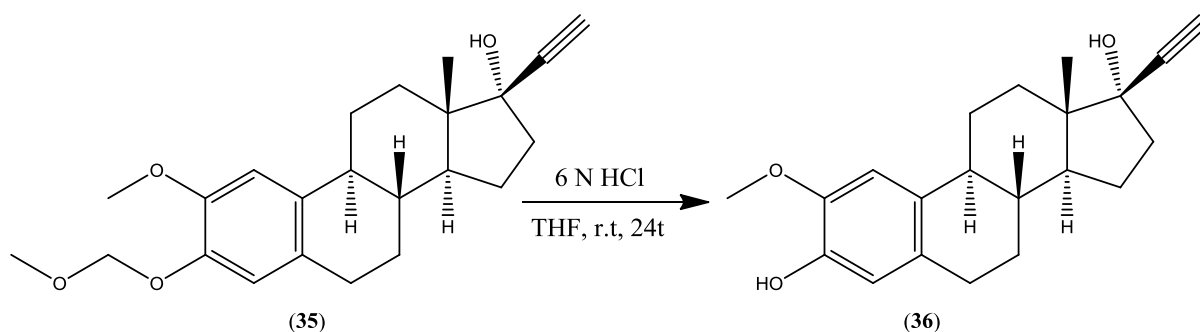


Spekter 9.11: IR-spekter av forbindelse 35



Spekter 9.12: MS-spekter av forbindelse 35

9.6 Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol



Referanse

Edsall, Allison B., Mohanakrishnan, Arasambattu K., Yang, Donglai, Fanwick, Philip E., Hamel, Ernest, Hanson, Arthur D., Agoston, Gregory E., Cushman, Mark, *J. Med. Chem* 2004, **47**(21):5126-5139.

Fremgangsmåte

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 35	0,27	1	100 mg	-	370	-	-
6N HCl	18	67	-	3	36	-	-
THF	-	-	-	10	72	0,89	66

Forbindelse **35** (100 mg, 0,27 mmol) og THF (5 ml) ble tilsatt i en 25 ml rundkolbe. En løsning 6 N HCl (3ml) ble tilsatt til løsningen og ble rørt i 24 timer ved romtemperatur. Da TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet, ble det tilsatt mettet NaCl-løsning (20 ml) og deretter ble blandingen ekstrahert med EtOAc (3 x 20 ml). De kombinerte organiske fasene ble vasket med mettet NaHCO₃ (10 ml) og vann (10 ml) Blandingene ble så tørket over MgSO₄ og deretter dampet under redusert trykk. Dette resulterte i et oransje oljeaktig råprodukt som ble rensert ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 18:1; R_f = 0,36).

Data:

Utbytte: 65 %

Produkt: Oransje fast stoff

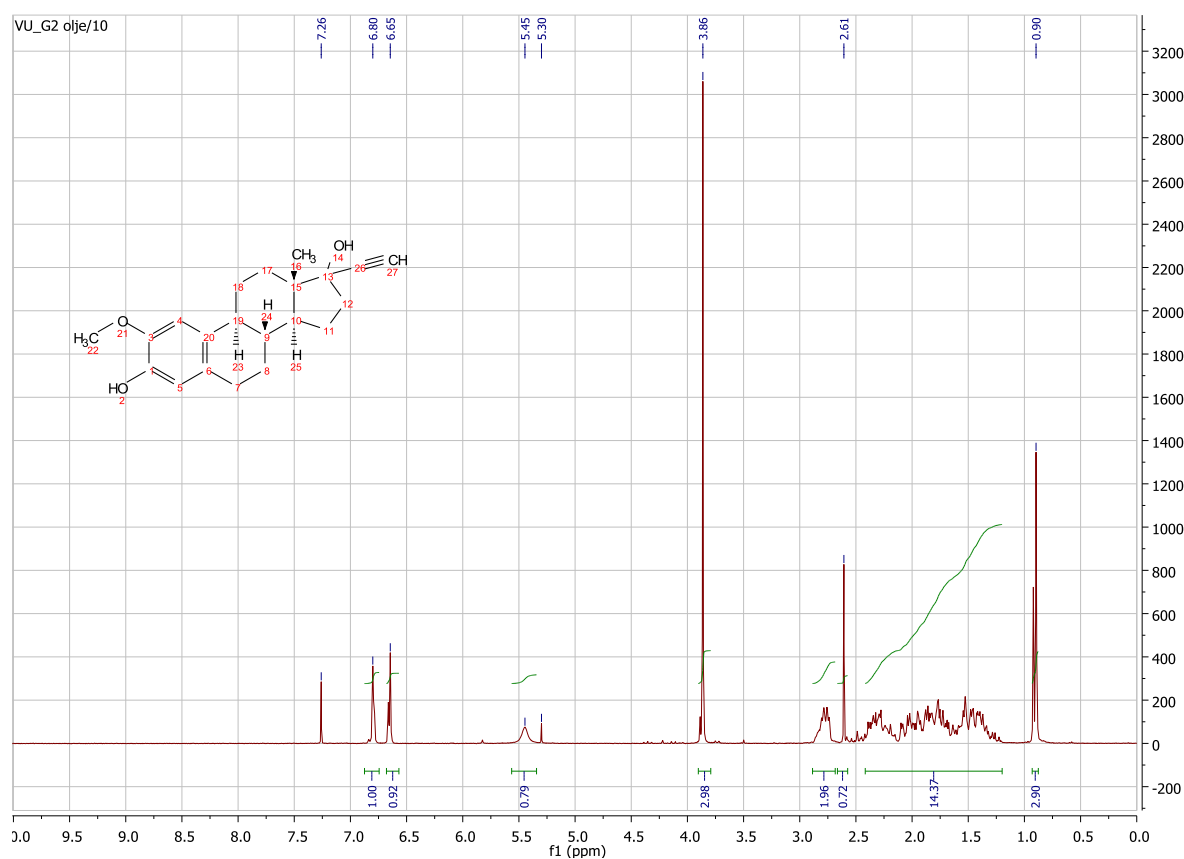
Smeltepunkt: 137-141 °C

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 6.80 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.77 (2H), 2.61 (s, 1H), 2.42 – 1.20 (m, 14H), 0.90 (s, 3H).

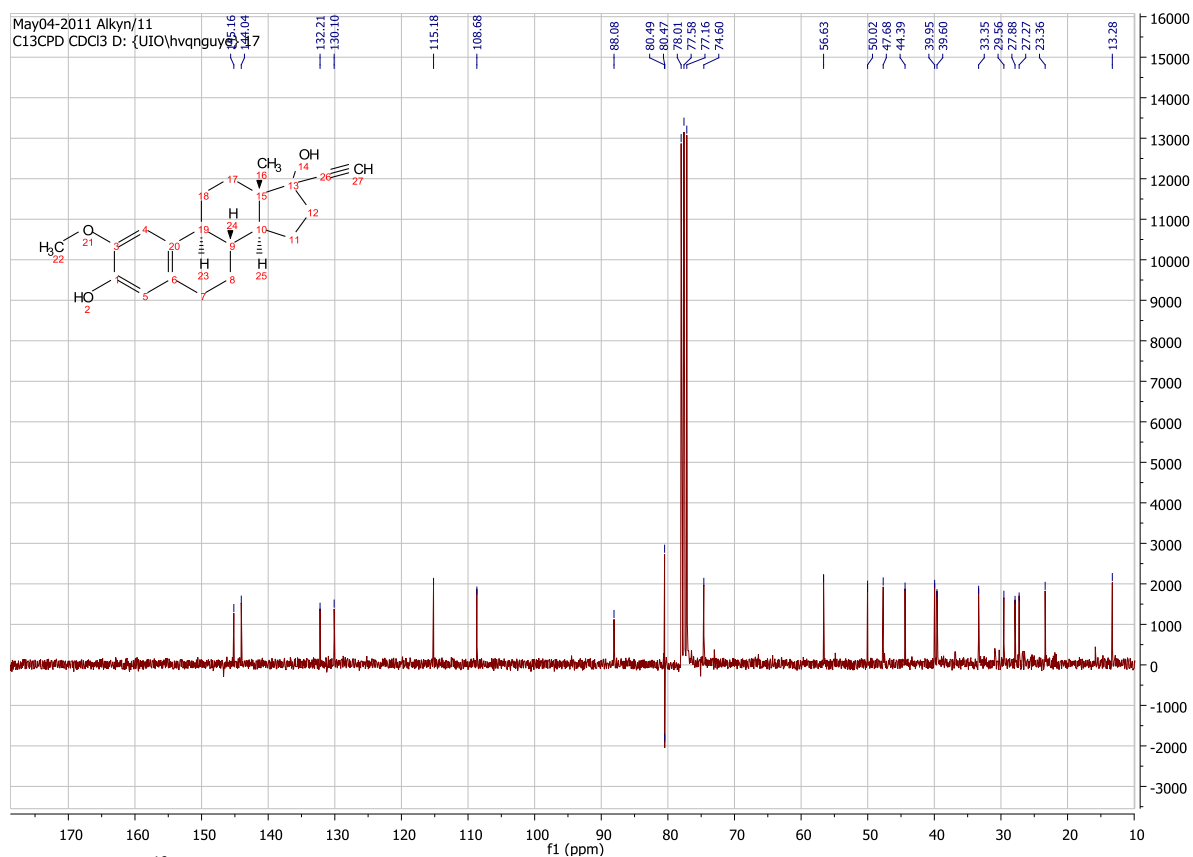
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 145.16, 144.04, 132.21, 130.10, 115.18, 108.68, 88.08, 74.60, 56.63, 50.02, 47.68, 44.39, 39.95, 39.60, 33.35, 29.56, 27.88, 27.27, 23.36, 13.28.

IR (Utvalgte topper): 3572 cm^{-1} , 2306 cm^{-1}

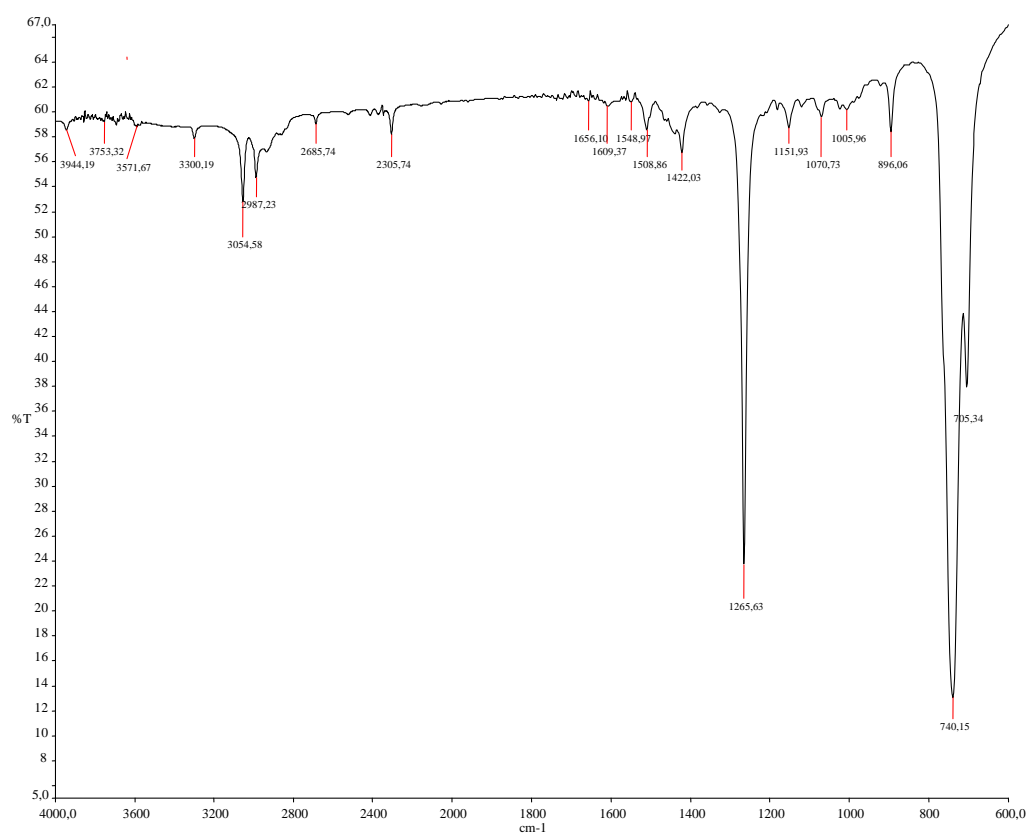
MS (EI): $m/z = 326\text{ (M}^+)$, $327\text{ (M}^++1)$



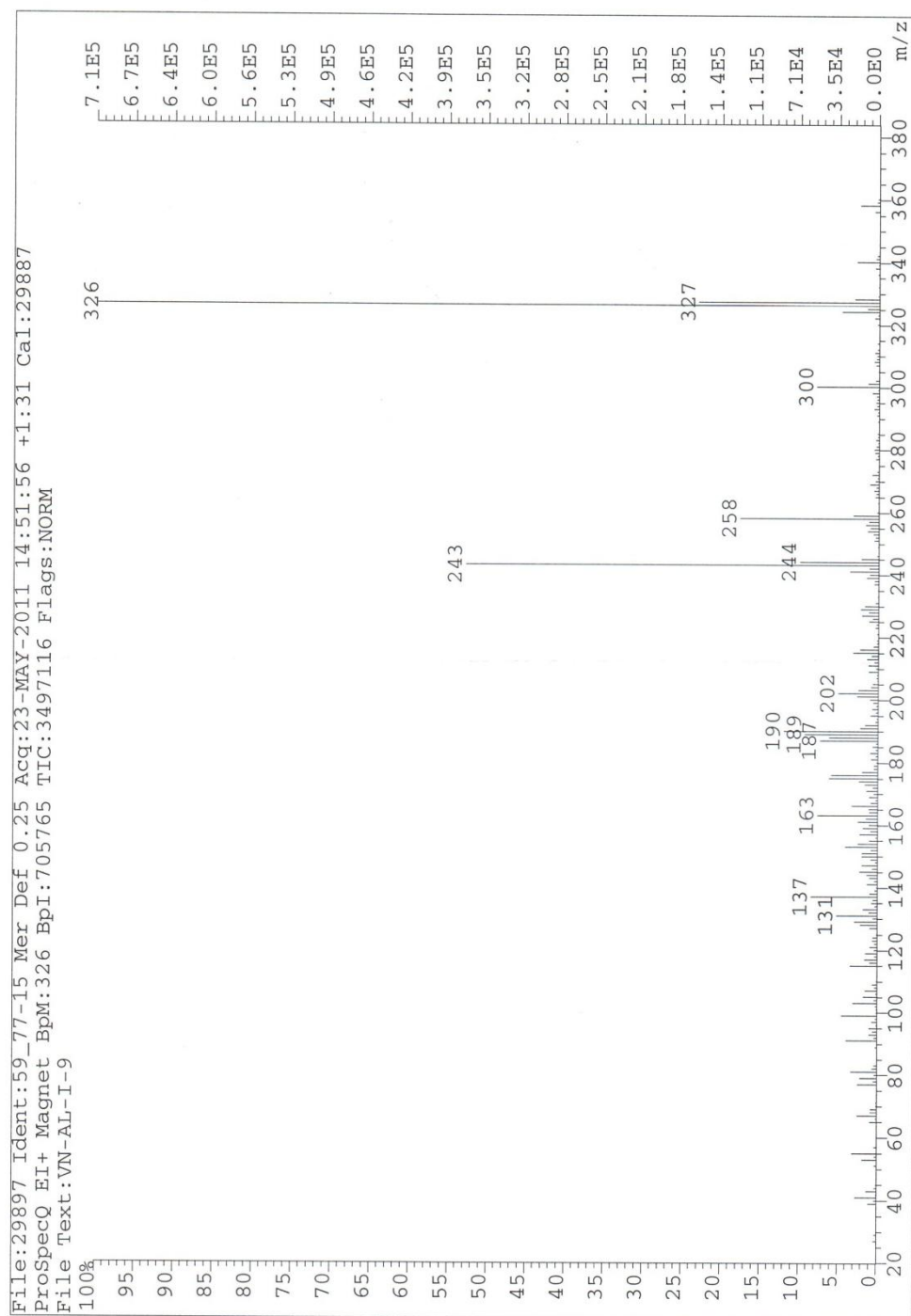
Spekter 9.13: ^1H -NMR spekter av forbindelse 36



Spekter 9.14: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 36

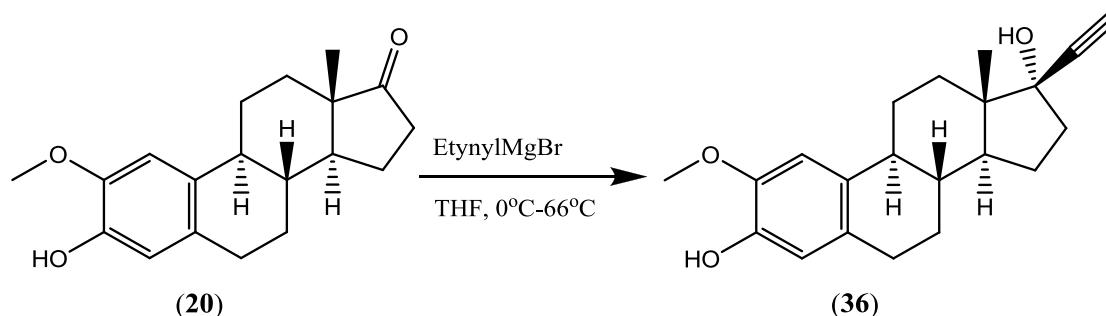


Spekter 9.15: IR-spekter av forbindelse 36



Spekter 9.16: MS spekter av forbindelse **36**

9.7 Syntese av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol fra 2-metoksi- β -estrone



Referanse

Edsall, Allison B., Mohanakrishnan, Arasambattu K., Yang, Donglai, Fanwick, Philip E., Hamel, Ernest, Hanson, Arthur D., Agoston, Gregory E., Cushman, Mark, *J. Med. Chem* 2004, **47**(21):5126-5139.

Fremgangsmåte

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 20	0,67	1	200 mg	-	300	-	-
0,5M etynylMgBr i THF	6,7	10	-	13,4	-	0,94	66
THF	-	-	-	10	72	0,89	66

En 0,5 M løsning av etynylmagnesiumbromid i THF (13,4 ml, 6,7 mmol) ble tilsatt i en 50 ml rundkolbe under nitrogen. Løsningen ble avkjølt til 0 °C. Etter avkjølingen ble en løsning av forbindelse **20** (200 mg, 0,67 mmol) i THF (10 ml) tilsatt dråpevis til blandingen. Reaksjonen ble rørt ved romtemperatur i ca. 20 timer. Da TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet ble det tilsatt 2 M NH₄Cl løsning (~ 20 ml) slik at reaksjonen ble avsluttet, og pH ble justert til ca 5-6. Blandingen ble så videre ekstrahert med EtOAc (3 x 30 ml). Organiske fasen ble vasket med vann (20 ml) og tørket over MgSO₄. Blandingen ble dampet under redusert trykk. Dette resulterte i et oransje fast stoff. Dette ble rensert ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 18:1; R_f = 0,32).

Data:

Smeltepunktet: 137-141 °C

Utbyttet: 63 %

Produkt: oransje fast stoff

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 6.80 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.77 (2H), 2.61 (s, 1H), 2.42 – 1.20 (m, 14H), 0.90 (s, 3H).

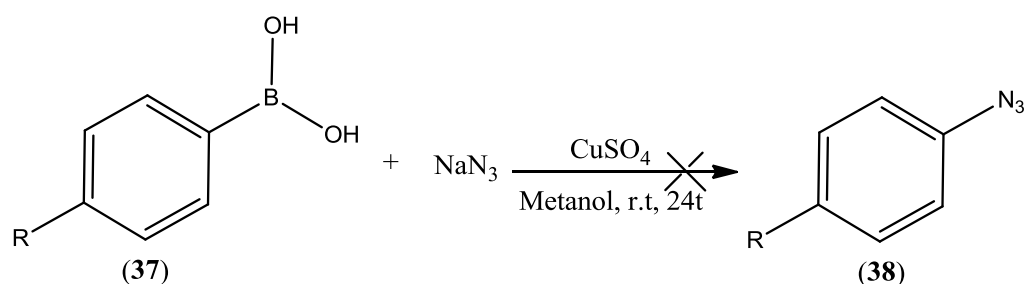
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 145.16, 144.04, 132.21, 130.10, 115.18, 108.68, 88.08, 74.60, 56.63, 50.02, 47.68, 44.39, 39.95, 39.60, 33.35, 29.56, 27.88, 27.27, 23.36, 13.28.

IR (Utvalgte topper): 3572 cm^{-1} , 2306 cm^{-1}

MS (EI): $m/z = 326$ (M^+), 327 ($\text{M}^+ + 1$)

^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS-spekter og IR-spekter er identitsk med spektrene til forbindelsen da **36** ble syntetisert fra **35**.

9.8 Forsøk på å syntetisere arylazider



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 37	1	1	-	-	-	-	-
NaN ₃	1,2	1,2	78 mg	-	65	-	-
CuSO ₄	0,1	0,1	16 mg	-	160	-	-
Metanol	-	-	-	3	32	0,79	65

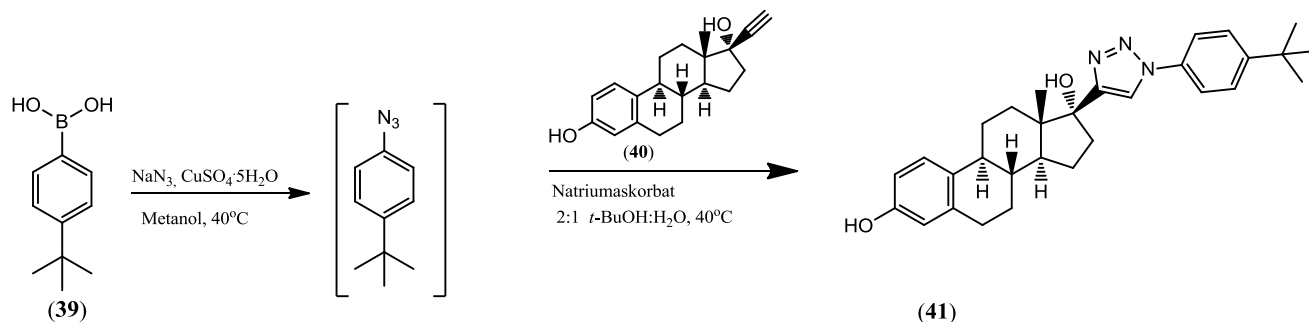
Generelt prosedyre for dannelse av arylazidene: NaN₃ (78 mg, 1,2 mmol) og CuSO₄ (16 mg, 0,1 mmol) ble tilsatt i en tørr 10 ml rundkolbe. Deretter ble metanol (3 ml) og borsyre (1 mmol) tilsatt til kolben. Blandingen ble rørt ved romtemperatur inntil TLC viste ingen tegn til startmaterialet. Blandingen ble i starten svart, men endret seg i til lysegrønn. Blandingen ble så dampet under redusert trykk. Dette resulterte i et svart fast stoff. Arylazidene ble så isolert ved ekstraksjon med dietyleter.

Kommentar til forsøket

Det ble forsøkt å syntetisere 5 arylazider, benzylazid, *para*-tolyl-azide, *para*-metoksi-fenyl-azid, *para*-tert-fenyl-azid og *para*-fluor-fenyl-azid. Å isolere disse forbindelsene førte til problemer. For alle fem forbindelsene viste TLC tegn på at dannelsen hadde skjedd, men ¹H-NMR ga ikke den samme antydningen. Det viste seg at arylazider har ganske lavt kokepunkt. Disse forbindelsene har sannsynligvis forsvunnet under inndampingen rotavaporen sammen med løsemiddelet. I tillegg er arylazider ustabile, og selv om man klarer å isolere dem og holde dem kaldt og mørkt, vil de likevel dekomponere etter noen dager.

Data: Ikke produkt

9.9 Syntese av 17-β-(1-*para-tert*-butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 39	0,38	1,08	68 mg	-	178	-	-
NaN ₃	0,39	1,1	25 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,038	0,01	10 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	1	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,15	0,43	30 mg	-	198	-	-
Forbindelse 40	0,35	1	104 mg	-	296	-	-

NaN₃ (25 mg, 0,39 mmol), CuSO₄·5H₂O (10 mg, 0,038 mmol) og forbindelse **39** (68 mg, 0,38 mmol) ble løst i metanol (1 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (30 mg, 0,15 mmol) og forbindelse **40** (104 mg, 0,35 mmol).

Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til forbindelse **40**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelsen av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂. Denne organiske fasen ble dampet inn på rotarvapor. Råproduktet ble rensert ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1; R_f = 0,36).

Data:

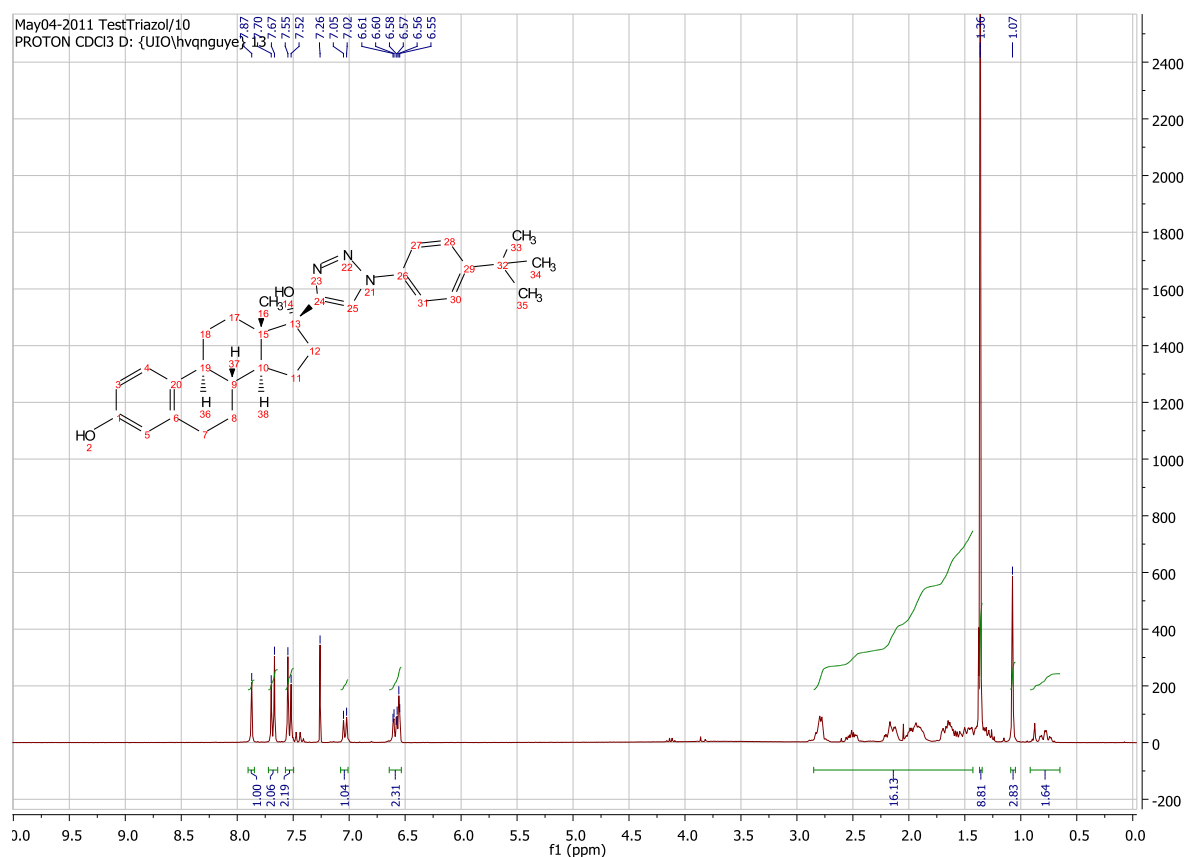
Smeltepunkt: 152-156 °C.

Utbyttet: 57 %

Produkt: Oransje fast stoff

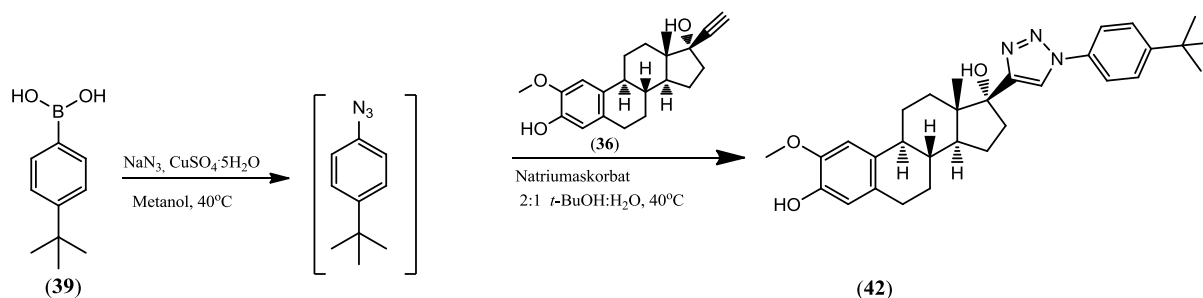
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.87 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.64 – 6.53 (m, 2H), 2.85 – 1.43 (m, 16H), 1.36 (s, 9H), 1.07 (s, 3H), 0.92 – 0.65 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 154.28, 153.55, 152.30, 138.33, 134.73, 133.69, 126.78, 126.53, 120.31, 119.61, 115.41, 112.81, 82.69, 48.70, 47.59, 43.40, 39.61, 38.20, 34.93, 33.14, 31.41, 29.80, 27.39, 26.40, 23.64, 14.40.



Spekter 9.17: ¹H-NMR spekter av forbindelse 41

9.10 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-*para-tert*-butyl-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 39	0,25	1	45 mg	-	178	-	-
NaN ₃	0,26	1,1	17 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,024	0,01	6 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	1	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,11	0,43	22 mg	-	198	-	-
Forbindelse 40	0,25	1	80 mg	-	296	-	-

NaN₃ (17 mg, 0,26 mmol), CuSO₄·5H₂O (6 mg, 0,024 mmol) og forbindelse **39** (45 mg, 0,25 mmol) ble løst i metanol (1 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (22 mg, 0,11 mmol) og forbindelse **36** (80 mg, 0,25 mmol).

Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt TLC ikke lengre viste noen tegn til forbindelse **36**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelse av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂. Denne organiske fasen ble dampet under redusert trykk på. Råproduktet ble rensed ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1; R_f = 0,32).

Data:

Smeltepunkt: 141-145 °C

Utbytte: 28 %

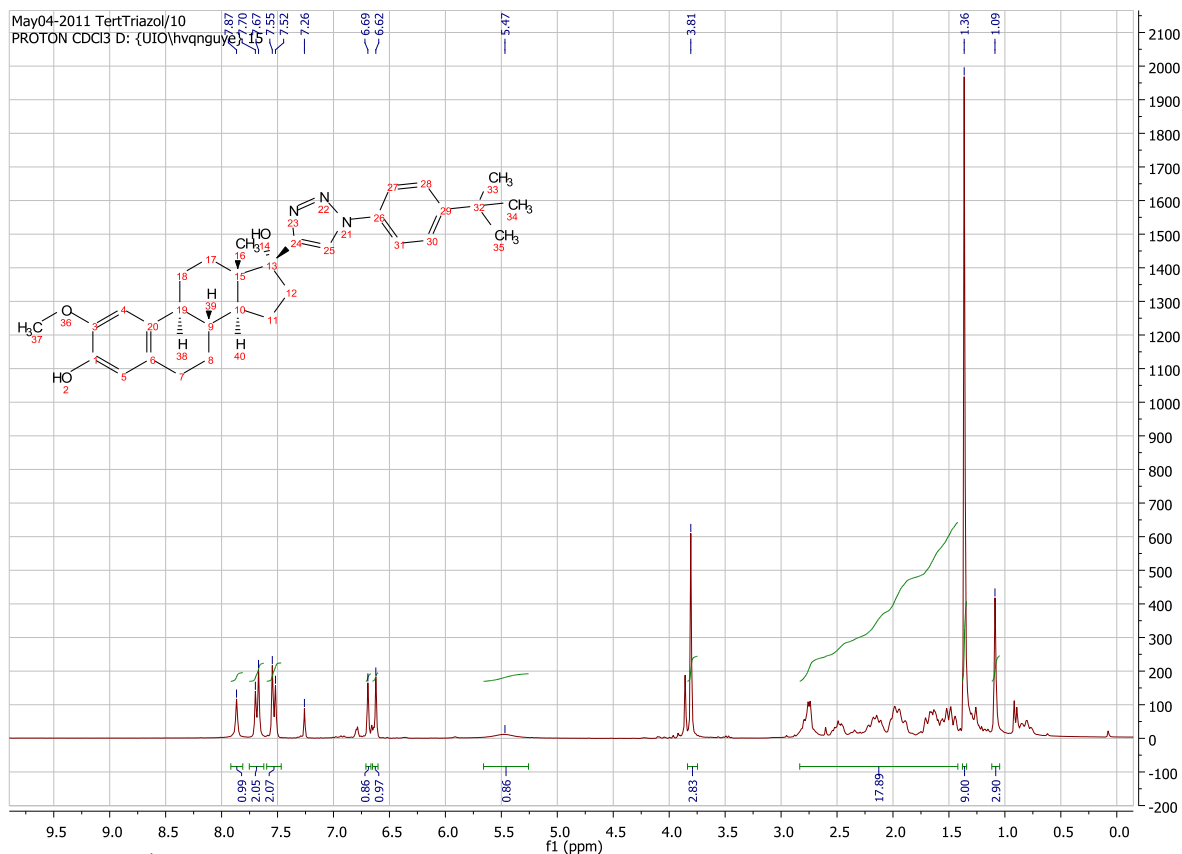
Produkt: Gult fast stoff

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.87 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.83 – 1.42 (m, 18H), 1.36 (s, 9H), 1.09 (s, 3H).

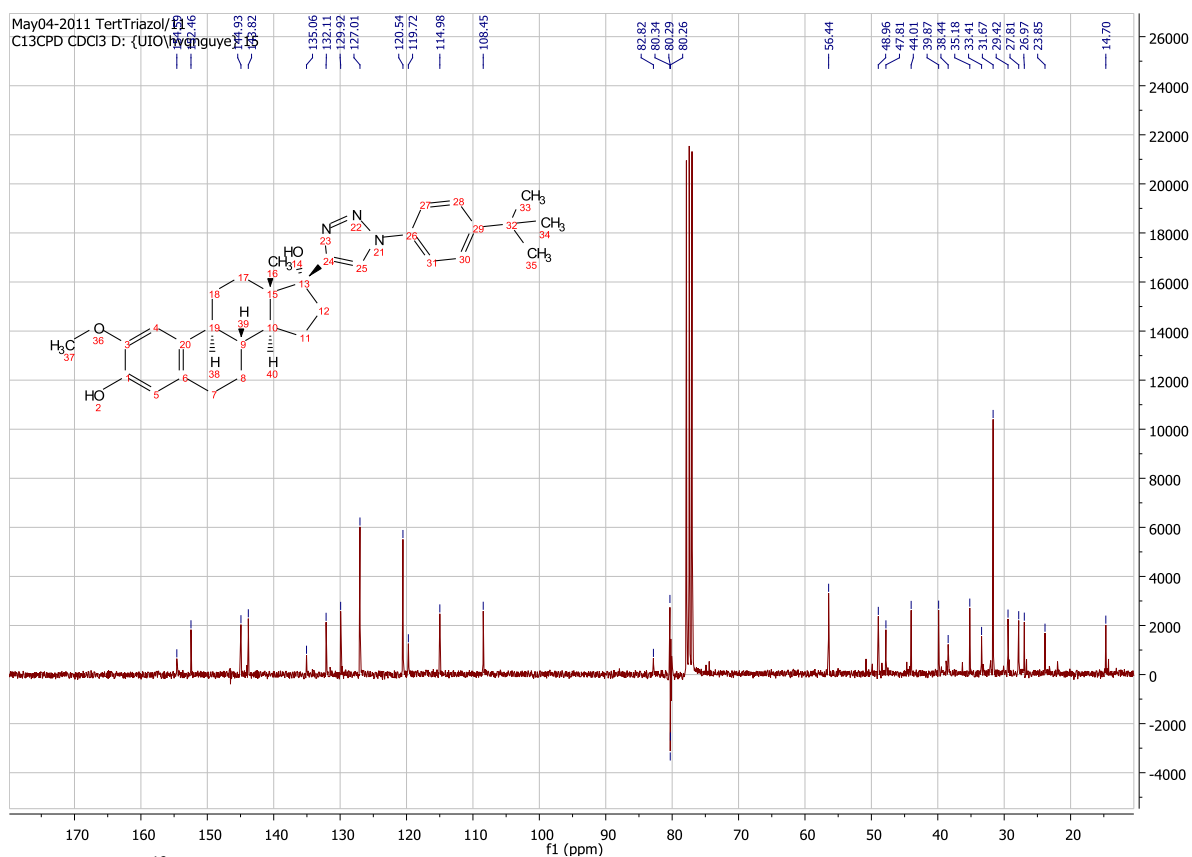
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 154.59, 152.46, 144.93, 143.82, 135.06, 132.11, 129.92, 127.01, 120.54, 119.72, 114.98, 108.45, 82.82, 56.44, 48.96, 47.81, 44.01, 39.87, 38.44, 35.18, 33.41, 31.67, 29.42, 27.81, 26.97, 23.85, 14.70.

IR (Utvalgte topper): 3538 cm^{-1} , 1508 cm^{-1}

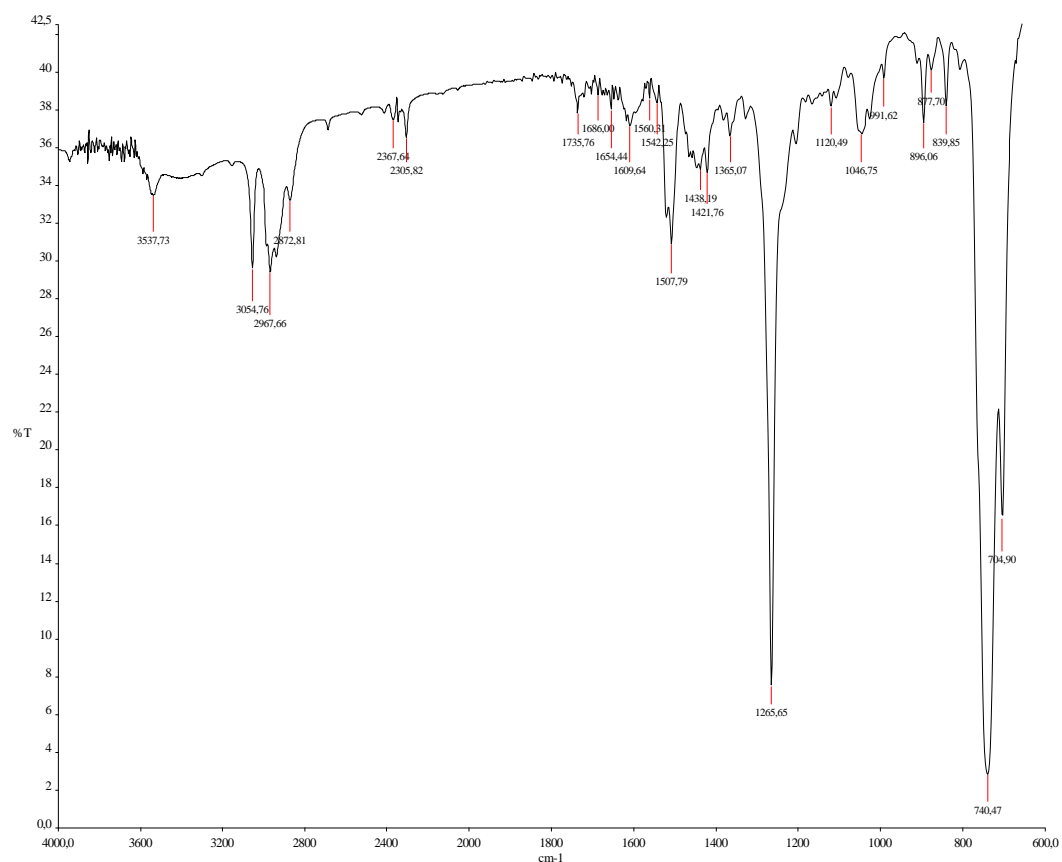
MS (EI): $m/z = 501$ ($\text{M}^{+\cdot}$), 502 (M^{++1})



Spekter 9.19: ^1H -NMR spekter av forbindelse **42**



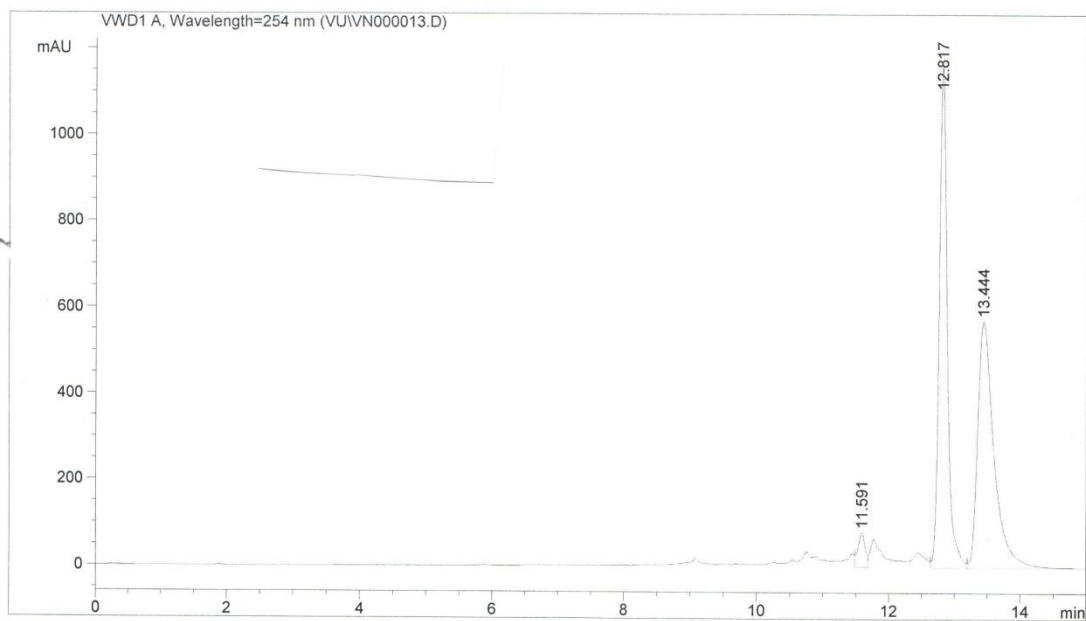
Spekter 9.20: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 42



Spekter 9.21: IR-spekter av forbindelse 42

Sample Name: VNTTert2

```
=====
Acq. Operator   : Vu
Acq. Instrument : Instrument 1          Location : Vial 2
Injection Date  : 16.05.2011 11:32:58
                                           Inj Volume : 5 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\SLOWER GRADIENT 13 MINUTES.M
Last changed    : 16.05.2011 11:32:04 by Vu
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\ALEXANDER\WASH.M
Last changed    : 08.03.2011 13:26:19 by Kumeet
Sample Info     :
```



Area Percent Report

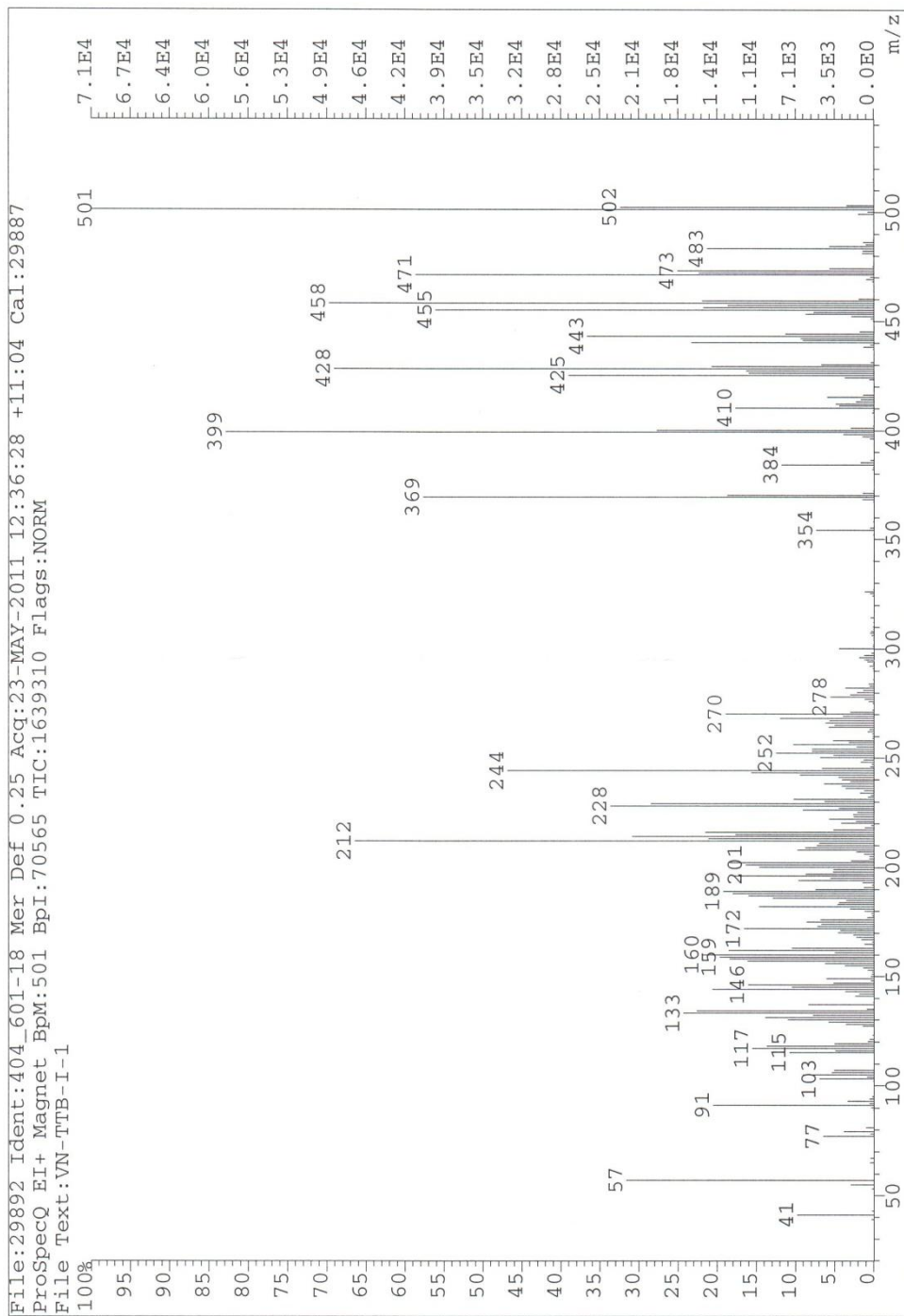
```
=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	11.591	VV	0.1128	619.92554	79.54340	3.0350
2	12.817	VV	0.1295	9997.90723	1162.08948	48.9478
3	13.444	VBA	0.2553	9807.82031	572.23346	48.0172

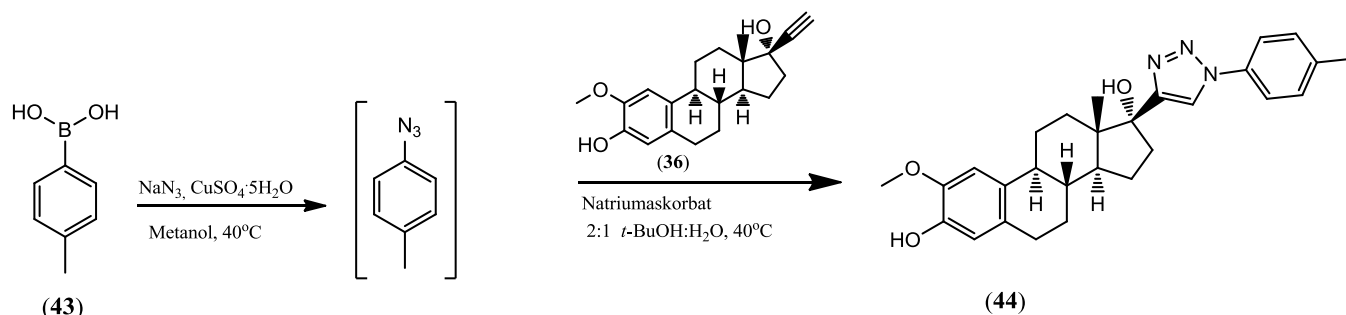
Totals : 2.04257e4 1813.86634

*** End of Report ***



Spekter 9.23: MS-spekter av forbindelse **42**

9.11 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-*para*-tolyl-1,2,3-triazol-4-yl)- østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 43	0,25	1	34 mg	-	136	-	-
NaN ₃	0,26	1,1	17 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,024	0,01	6 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	1	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,11	0,43	22 mg	-	198	-	-
Forbindelse 36	0,25	1	80 mg	-	326	-	-

NaN₃ (17 mg, 0,26 mmol), CuSO₄·5H₂O (6 mg, 0,024 mmol) og forbindelse **43** (34 mg, 0,25 mmol) ble løst i metanol (1 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (22 mg, 0,11 mmol) og forbindelse **36** (80 mg, 0,25 mmol).

Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt TLC ikke lengre viste noen tegn til forbindelse **36**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelse av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂. Denne organiske fasen ble dampet under redusert trykk på. Råproduktet ble rensed ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1; R_f = 0,32).

Data:

Smeltepunkt: 142-144 °C

Utbytte: 30 %

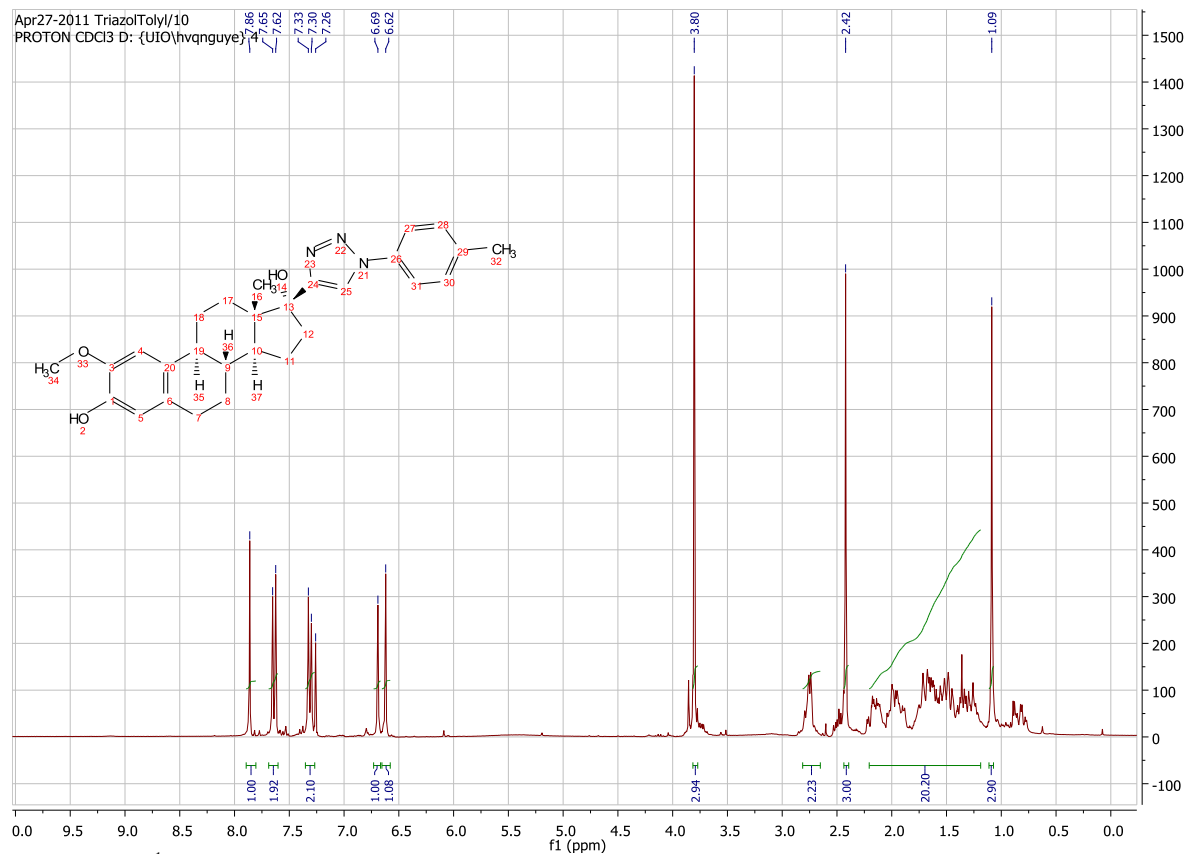
Produkt: Hvitt fast stoff

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.86 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.81 – 2.65 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.22 – 1.83 (m, 6H), 1.80 – 1.19 (m, 14H), 1.09 (s, 3H), 0.95 – 0.70 (m, 2H).

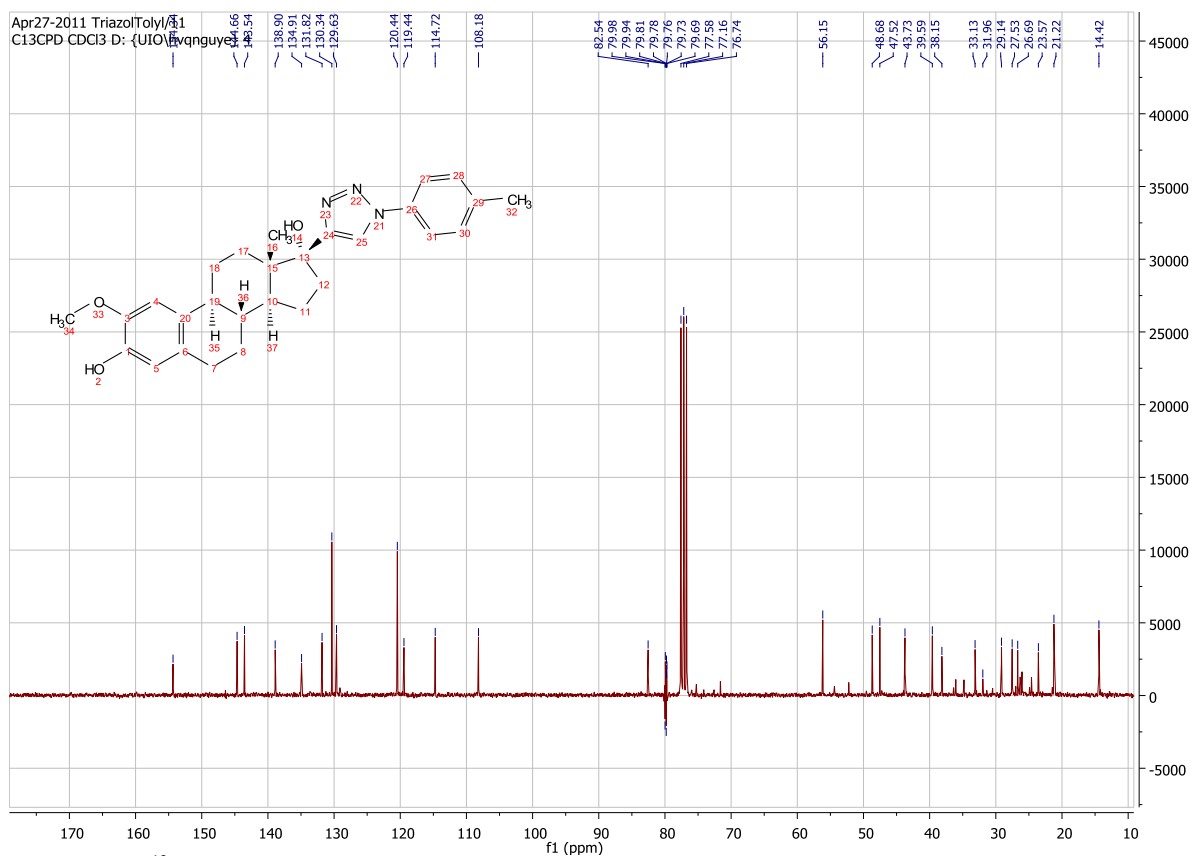
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 154.34, 144.66, 143.54, 138.90, 134.91, 131.82, 130.34, 129.63, 120.44, 119.44, 114.72, 108.18, 82.54, 56.15, 48.68, 47.52, 43.73, 39.59, 38.15, 33.13, 29.14, 27.53, 26.69, 23.57, 21.22, 14.42.

IR (Utvalgte topper): 3402 cm⁻¹ 1518 cm⁻¹

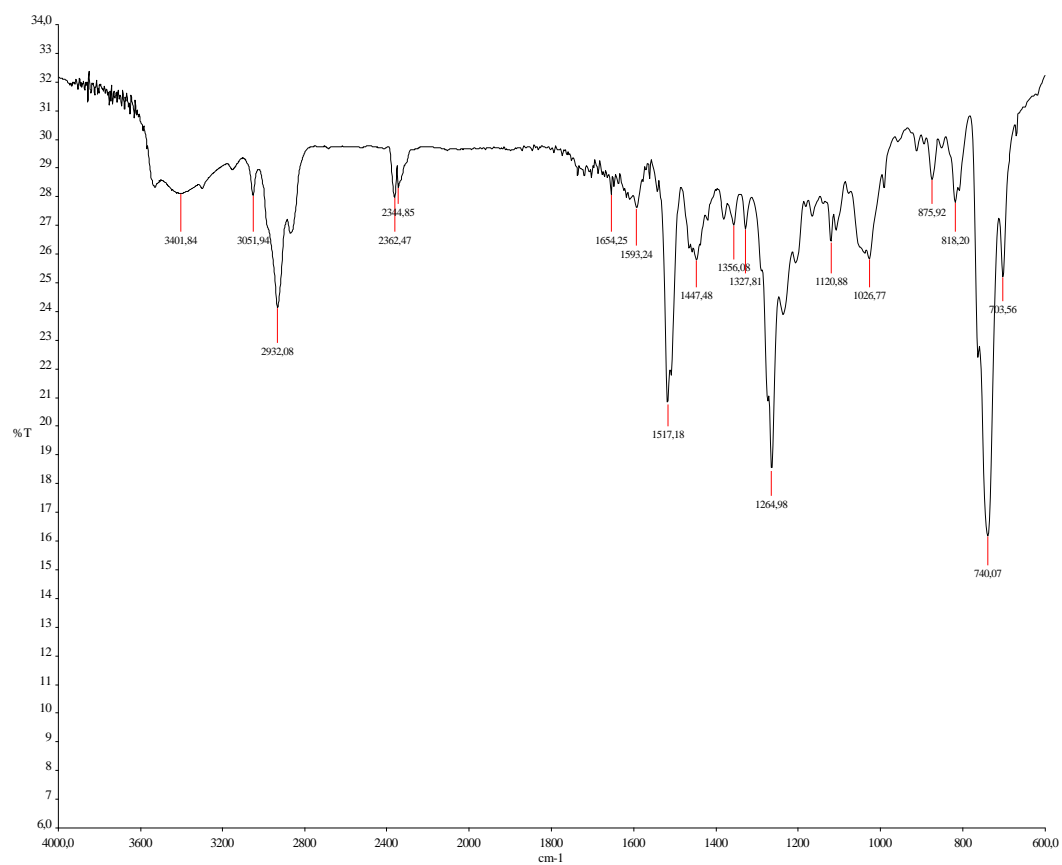
MS (EI): *m/z* = 459 (M⁺·), 460 (M⁺+1)



Spekter 9.24: ¹H-NMR spekter av forbindelse 44



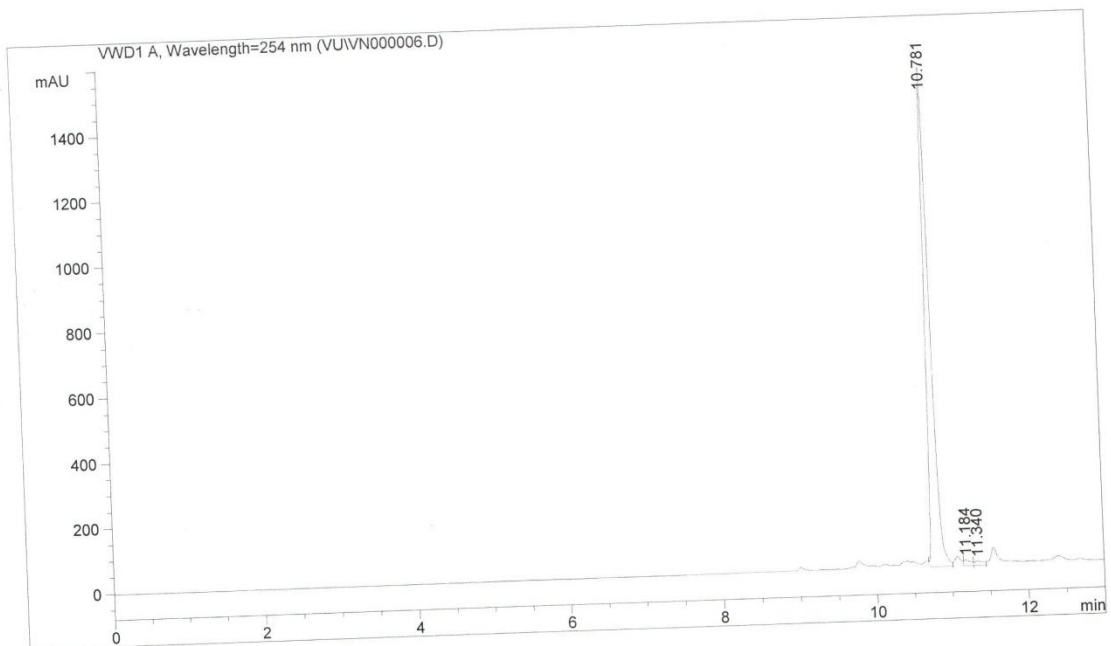
Spekter 9.25: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 44



Spekter 9.26: IR-spekter av forbindelse 44

Data File C:\CHEM32\1\DATA\VU\VN000006.D
Sample Name: VNTTolyl

```
=====
Acq. Operator   : Vu                      Location : Vial 3
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date  : 16.05.2011 10:13:56      Inj Volume : 5 µl
                                           GRADIENT 13 MINUTES.M
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\SLOWER
Last changed    : 13.05.2011 13:35:04 by Vu
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\ALEXANDER\WASH.M
Last changed    : 08.03.2011 13:26:19 by Kumeet
Sample Info     :
=====
```



=====
Area Percent Report
=====

```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

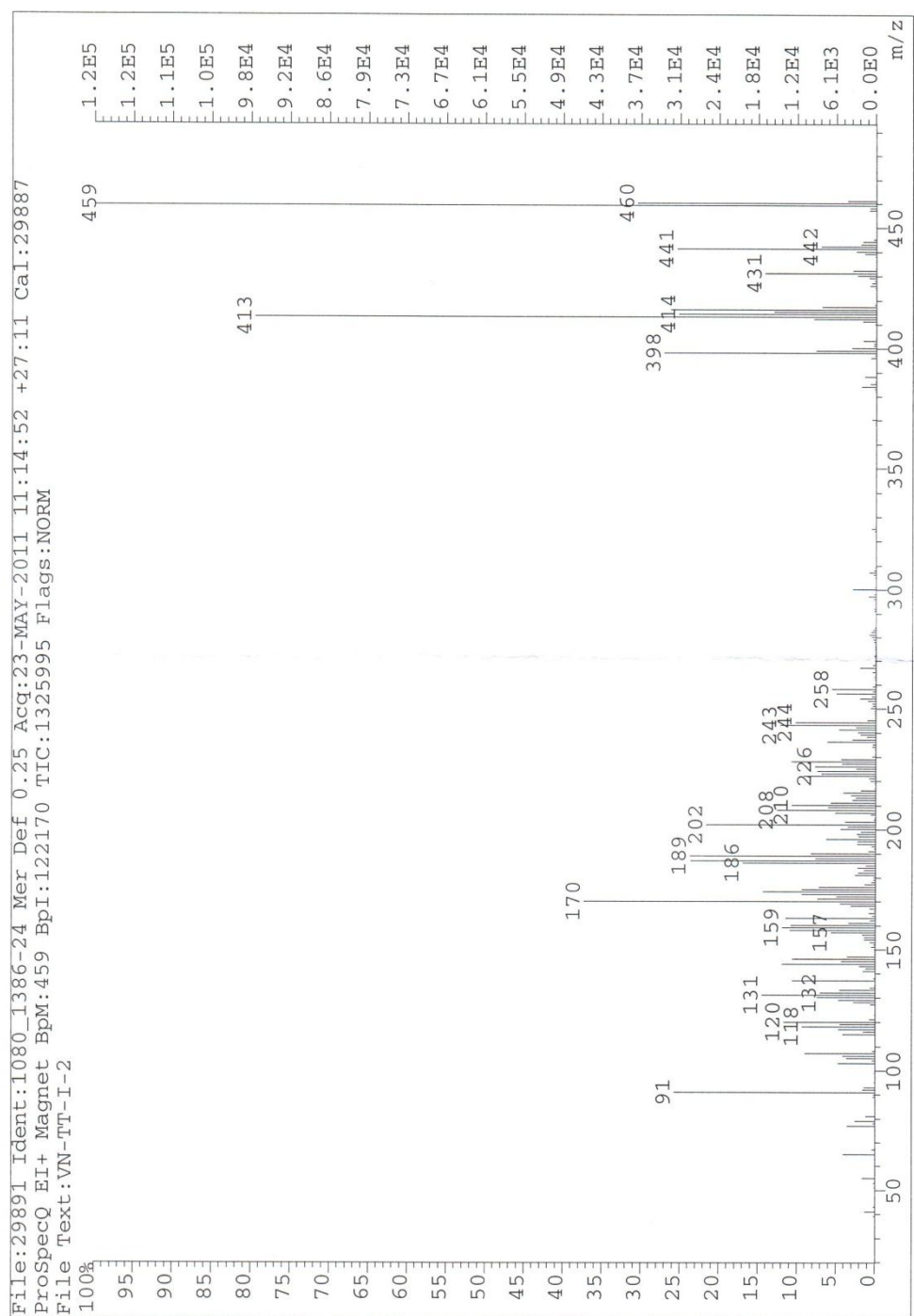
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	10.781	VV	0.0701	7089.26270	1529.64355	96.9707
2	11.184	VV	0.0868	110.25200	17.46319	1.5081
3	11.340	VV	0.1147	111.21350	12.96042	1.5212
Totals :				7310.72820	1560.06716	

=====
*** End of Report ***

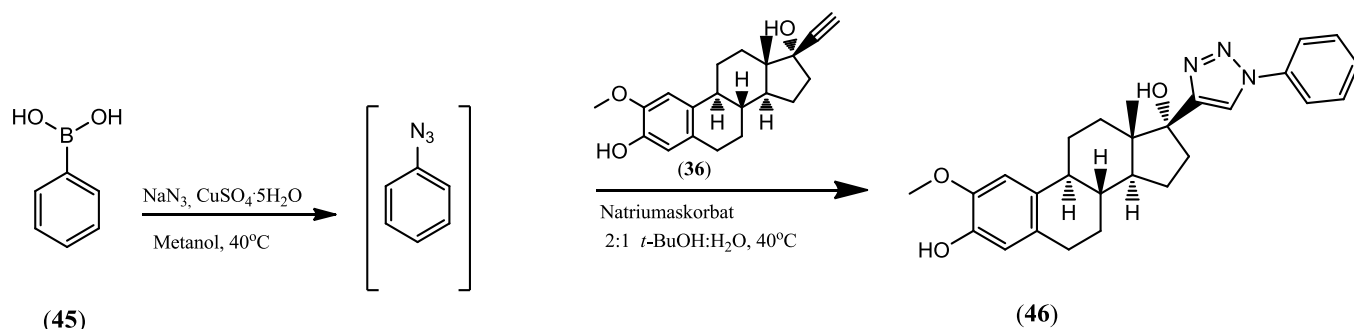
Instrument 1 23.05.2011 11:59:38 Vu

Page 1 of 1



Spekter 9.28: MS-spekter av forbindelse **44**

9.12 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)- østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 45	0,25	1	31 mg	-	122	-	-
NaN ₃	0,26	1,1	17 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,024	0,01	6 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	1	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,11	0,43	22 mg	-	198	-	-
Forbindelse 36	0,25	1	80 mg	-	326	-	-

NaN₃ (17 mg, 0,26 mmol), CuSO₄·5H₂O (6 mg, 0,024 mmol) og forbindelse **45** (31 mg, 0,25 mmol) ble løst i metanol (1 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil TLC ikke lenger viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (22 mg, 0,11 mmol) og forbindelse **36** (80 mg, 0,25 mmol).

Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt TLC ikke lenger viste noen tegn til forbindelse **36**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelse av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂. Denne organiske fasen ble dampet under redusert trykk på. Råproduktet ble rensert ved hjelp av kolonnekromatograf (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1; R_f = 0,32).

Data:

Utbytte: 36 %

Smeltepunkt: 141-145 °C

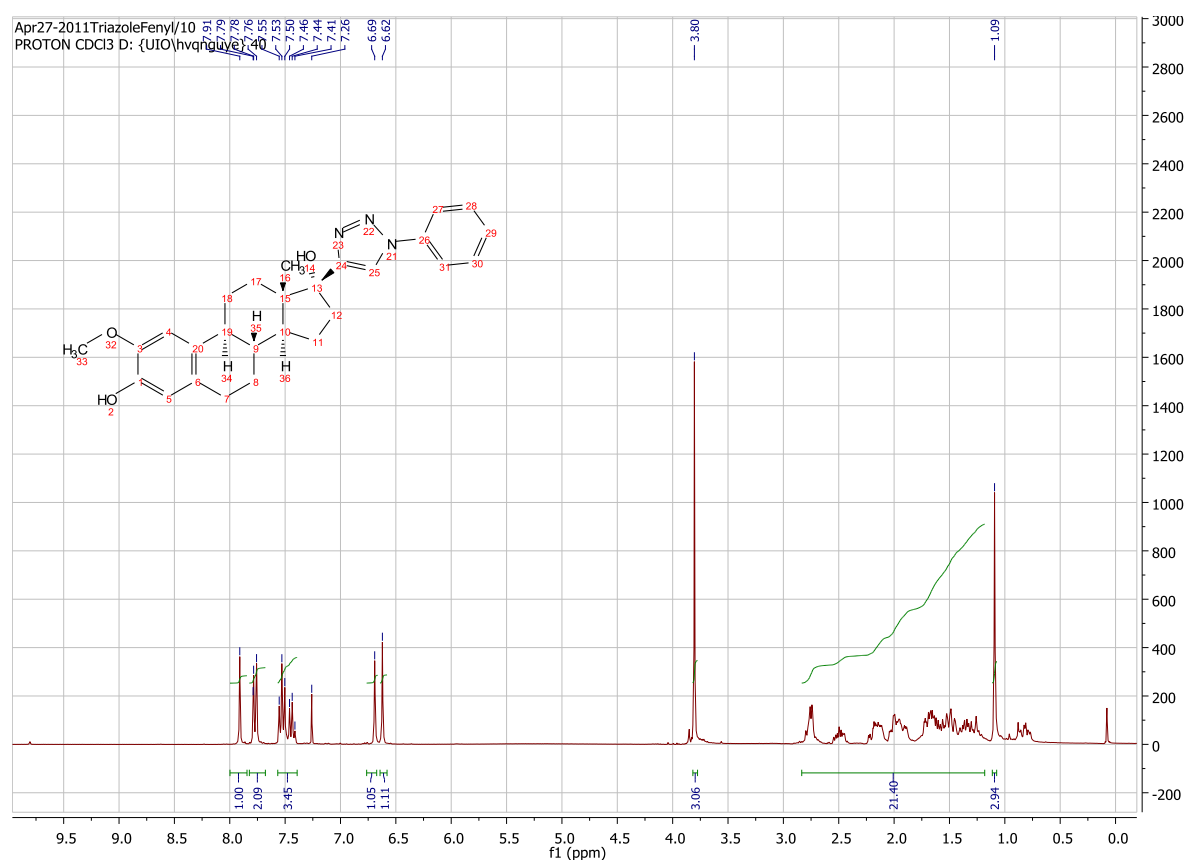
Produkt: Hvitt fast stoff

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.91 (s, 1H), 7.82 – 7.68 (m, 2H), 7.48 (dt, *J* = 7.3 Hz, 3H), 6.69 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.88 – 2.63 (m, 2H), 2.60 – 2.39 (m, 1H), 2.27 – 1.81 (m, 6H), 1.74 – 1.23 (m, 11H), 1.09 (s, 3H).

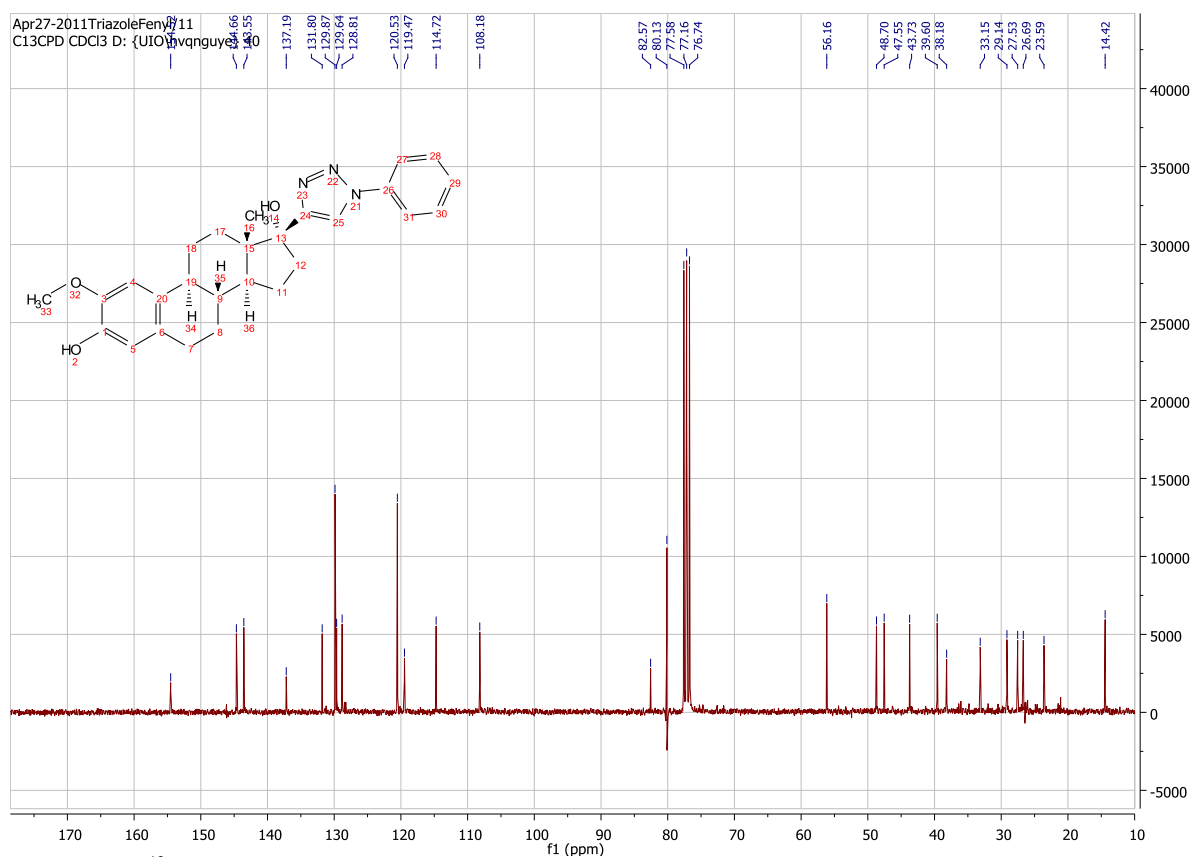
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 154.52, 144.66, 143.55, 137.19, 131.80, 129.87, 129.64, 128.81, 120.53, 119.47, 114.72, 108.18, 82.57, 56.16, 48.70, 47.55, 43.73, 39.60, 38.18, 33.15, 29.14, 27.53, 26.69, 23.59, 14.42.

IR (Utvalgte topper): 3538 cm⁻¹, 1506 cm⁻¹

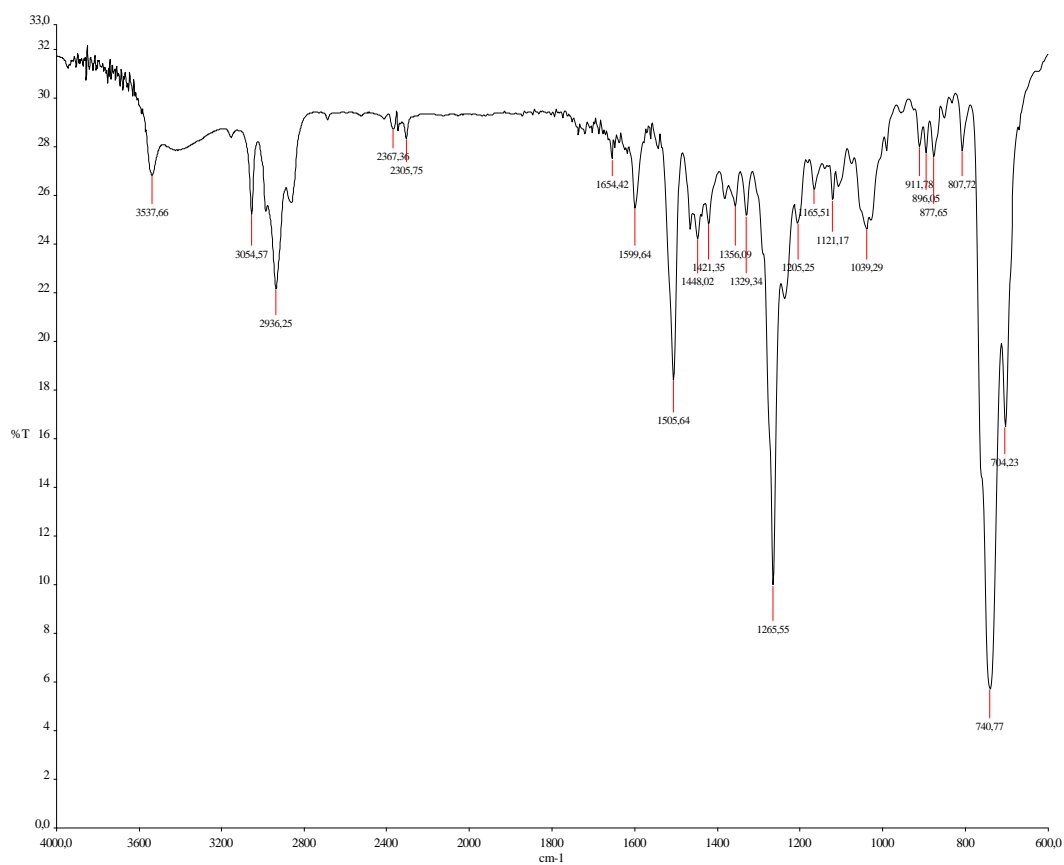
MS (EI): *m/z* = 445 (M⁺·), 446 (M⁺+1)



Spekter 9.29: ¹H-NMR spekter av forbindelse 46



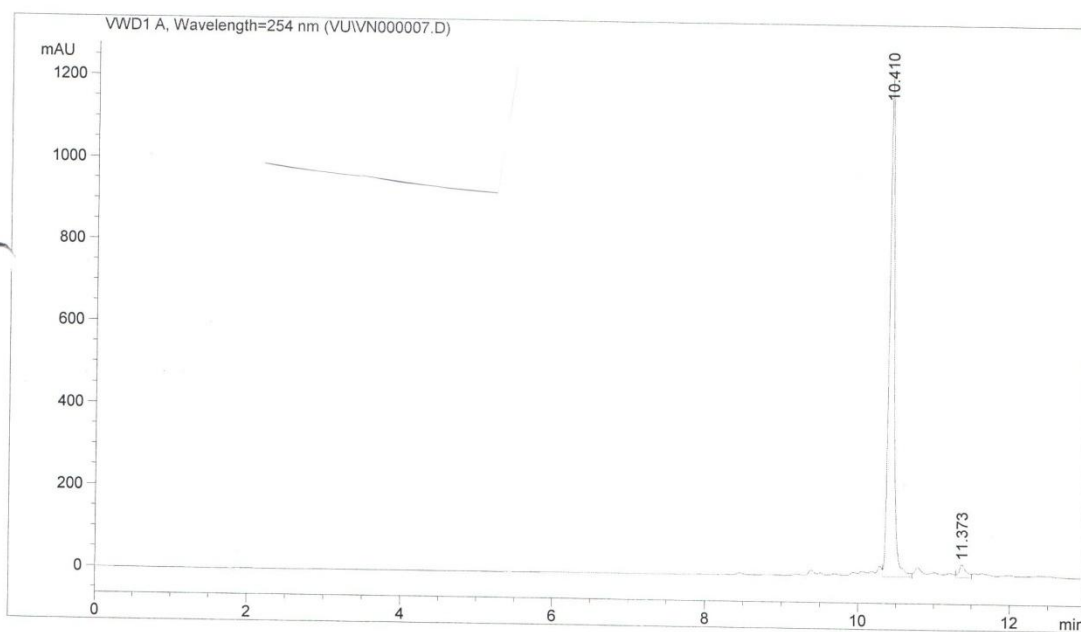
Spekter 9.30: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 46



Spekter 9.31: IR-spekter av forbindelse 46

data file C:\CHEM32\1\DATA\VO\VN000007.D
 Sample Name: VNTfenyl

```
=====
Acq. Operator   : Vu
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date  : 16.05.2011 10:28:41
Location       : Vial 4
Inj Volume     : 5 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\SLOWER GRADIENT 13 MINUTES.M
Last changed   : 13.05.2011 13:35:04 by Vu
Analysis Method: C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\SLOWER GRADIENT 13 MINUTES.M
Last changed   : 16.05.2011 10:44:59 by Vu
Sample Info    : (modified after loading)
=====
```



=====
 Area Percent Report
 =====

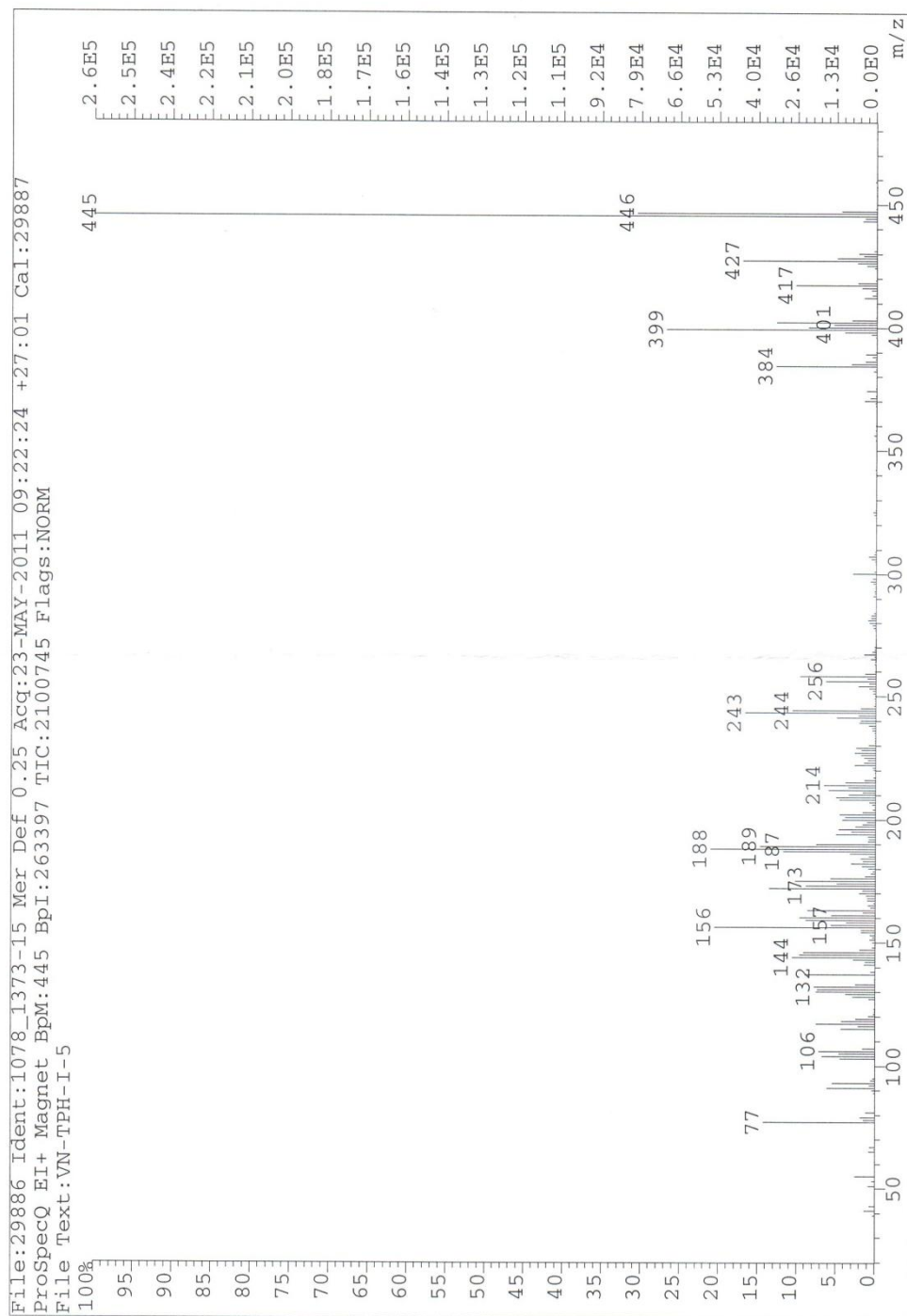
```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	10.410	VV	0.0708	5709.15625	1215.61792	96.5832
2	11.373	VV	0.0917	201.96880	31.13376	3.4168

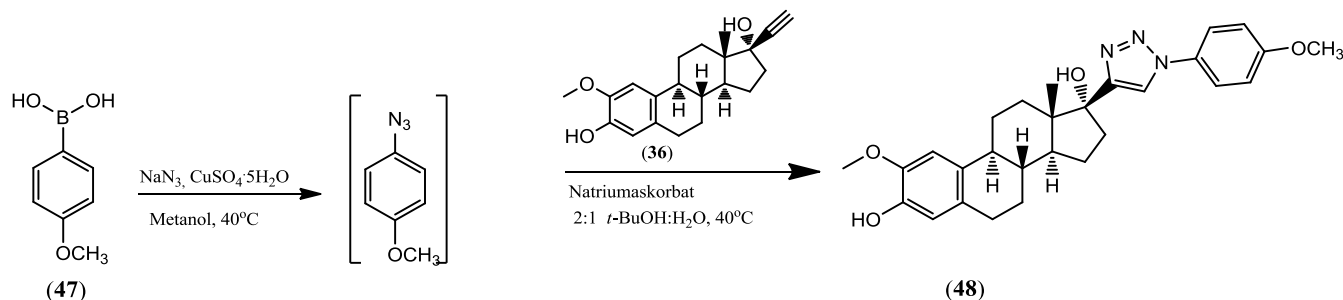
Totals : 5911.12505 1246.75168

=====
 *** End of Report ***
 =====



Spekter 9.33: MS-spekter av forbindelse **46**

9.13 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-*para*-metoksi-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 47	0,25	1	38 mg	-	152	-	-
NaN ₃	0,26	1,1	17 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,024	0,01	6 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	1	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,11	0,43	22 mg	-	198	-	-
Forbindelse 36	0,25	1	80 mg	-	326	-	-

NaN₃ (17 mg, 0,26 mmol), CuSO₄·5H₂O (6 mg, 0,024 mmol) og forbindelse **47** (38 mg, 0,25 mmol) ble løst i metanol (1 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (22 mg, 0,11 mmol) og forbindelse **36** (80 mg, 0,25 mmol).

Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt TLC ikke lengre viste noen tegn til forbindelse **36**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelse av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂. Denne organiske fasen ble dampet under redusert trykk på. Råproduktet ble rensset ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1; R_f = 0,32).

Data:

Utbytte: 36 %

Smeltepunkt: 121-127 °C

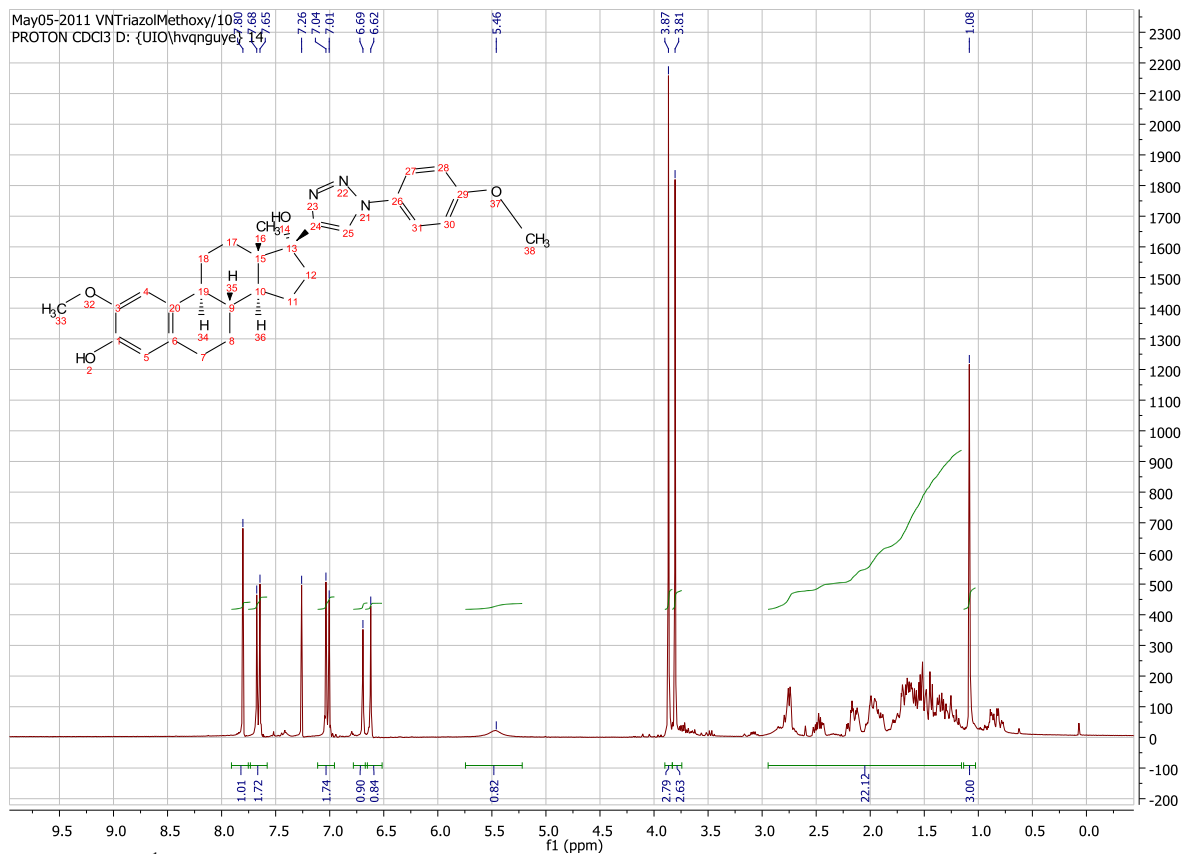
Produkt: Hvitt fast stoff

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.94 – 1.16 (m, 22H), 1.08 (s, 3H).

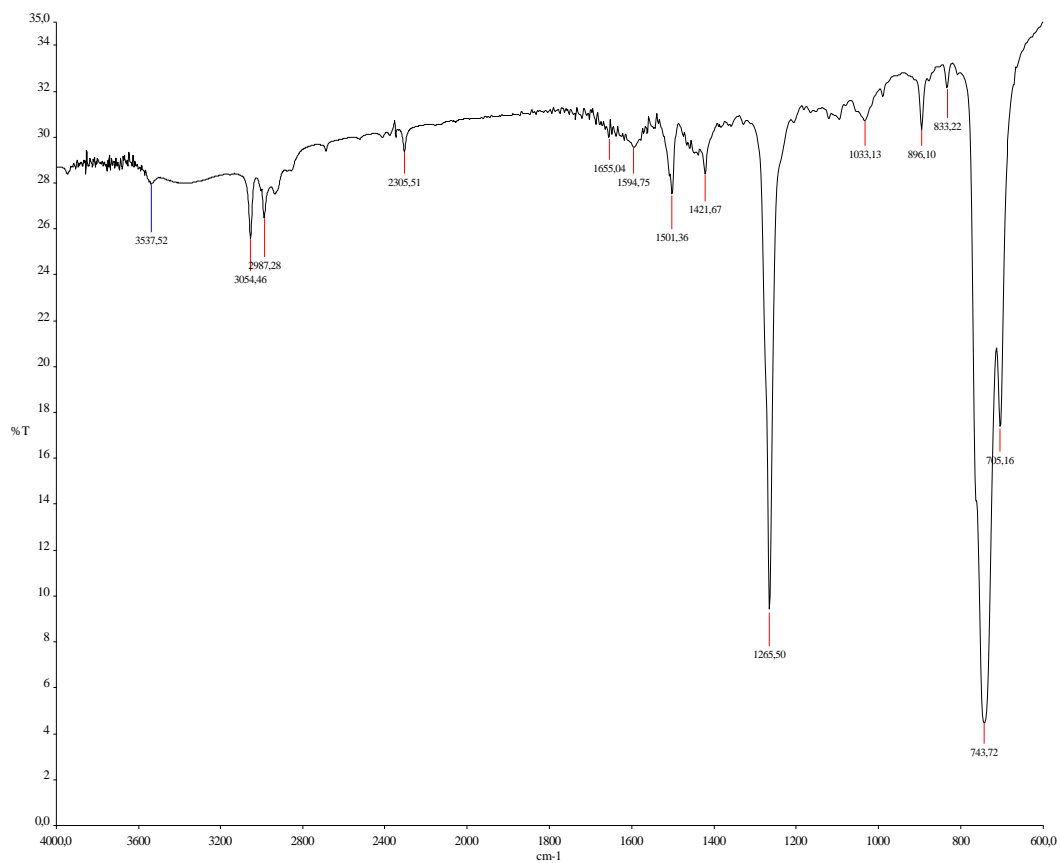
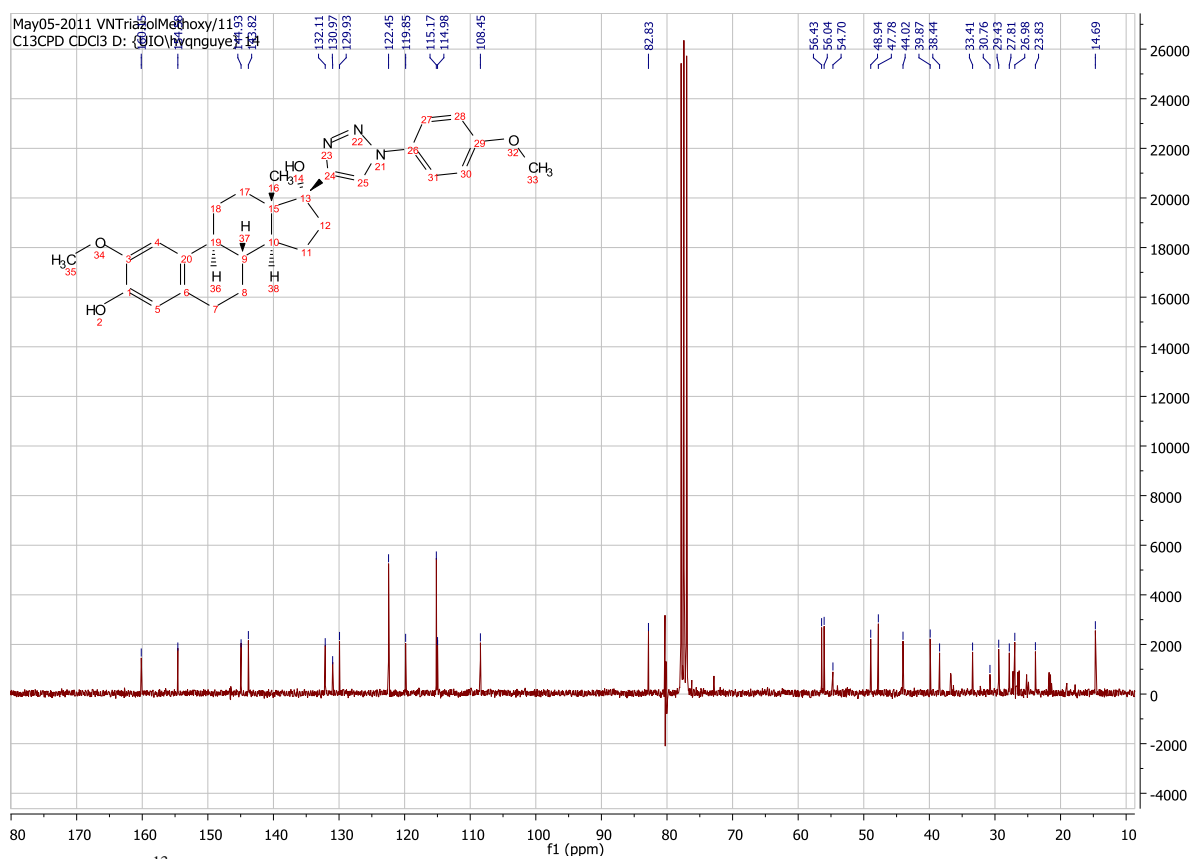
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 160.15, 154.58, 144.93, 143.82, 132.11, 130.97, 129.93, 122.45, 119.85, 115.17, 114.98, 108.45, 82.83, 56.43, 56.04, 54.70, 48.94, 47.78, 44.02, 39.87, 38.44, 33.41, 30.76, 29.43, 27.81, 26.98, 23.83, 14.69.

IR (Utvalgte topper): 3538 cm⁻¹, 1501 cm⁻¹

MS (EI): *m/z* = 475 (M⁺), 476 (M⁺+1)

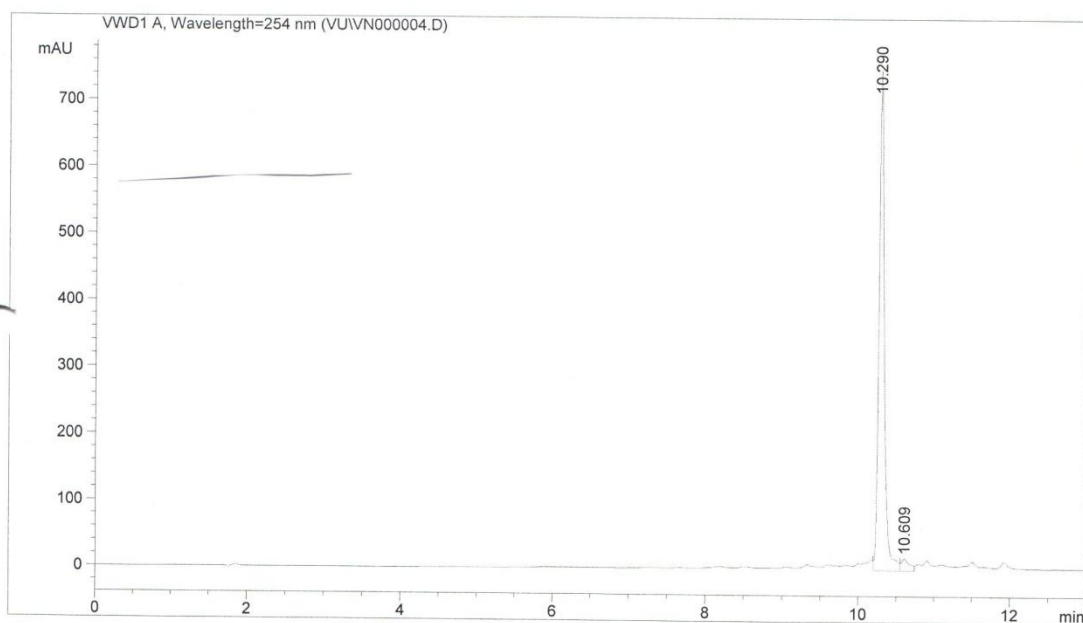


Spekter 9.34: ¹H-NMR spekter av forbindelse 48



File C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\VN000004.D
 Sample Name: VNTMetoxy

```
=====
Acq. Operator   : Vu
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date  : 16.05.2011 09:43:40
Location        : Vial 1
Inj Volume      : 5 µl
Method          : C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\SLOWER GRADIENT 13 MINUTES.M
Last changed    : 13.05.2011 13:35:04 by Vu
Sample Info     :
=====
```



=====
 Area Percent Report
 =====

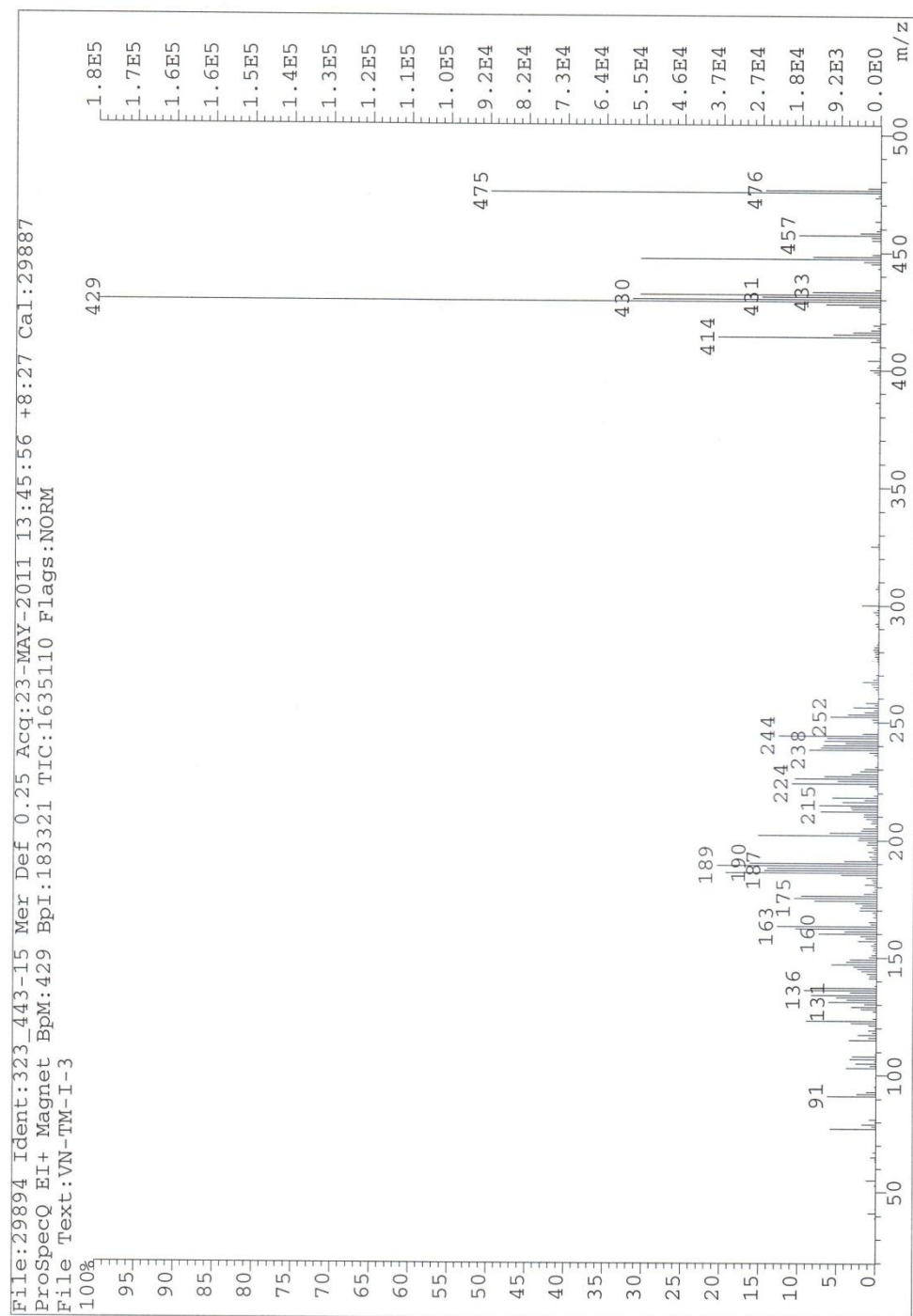
```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	10.290	VV	0.0736	3698.28931		749.30560	96.2845
2	10.609	VV	0.1063	142.71153		18.43931	3.7155

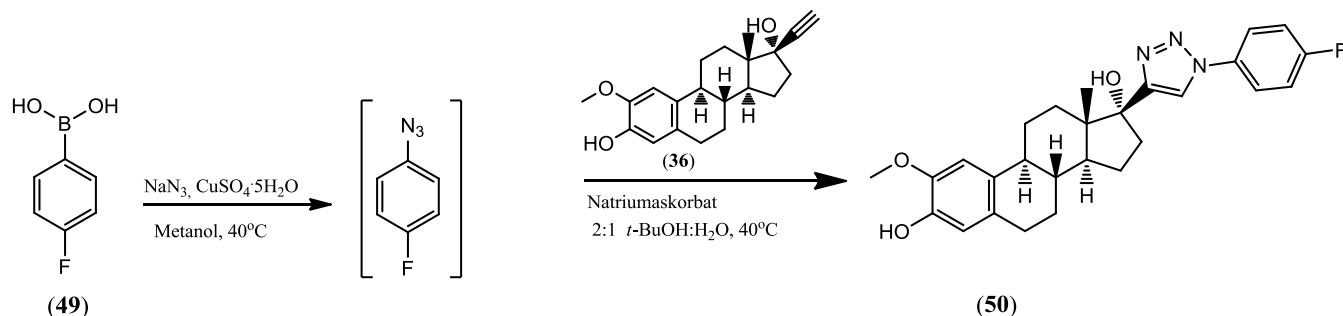
Totals : 3841.00084 767.74492

=====
 *** End of Report ***



Spekter 9.38: MS-spekter av forbindelse **48**

9.14 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-*para*-fluor-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 49	0,25	1	35 mg	-	140	-	-
NaN ₃	0,26	1,1	17 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,024	0,01	6 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	1	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,11	0,43	22 mg	-	198	-	-
Forbindelse 36	0,25	1	80 mg	-	326	-	-

NaN₃ (17 mg, 0,26 mmol), CuSO₄·5H₂O (6 mg, 0,024 mmol) og forbindelse **49** (35 mg, 0,25 mmol) ble løst i metanol (1 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (22 mg, 0,11 mmol) og forbindelse **36** (80 mg, 0,25 mmol).

Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt TLC ikke lengre viste noen tegn til forbindelse **36**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelse av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂. Denne organiske fasen ble dampet under redusert trykk på. Råproduktet ble rensed ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1; R_f = 0,32).

Data:

Utbytte: 26 %

Smeltepunkt: 119-124 °C

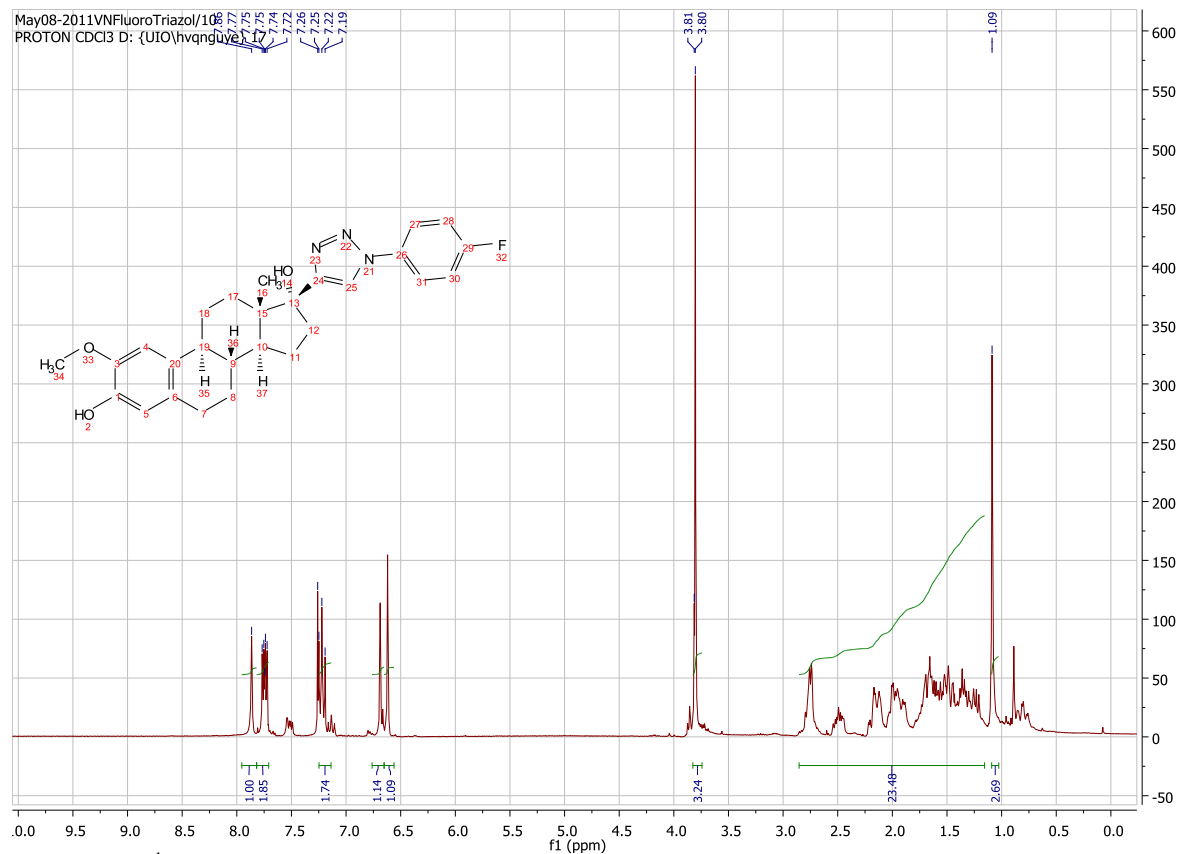
Produkt: Hvitt fast stoff

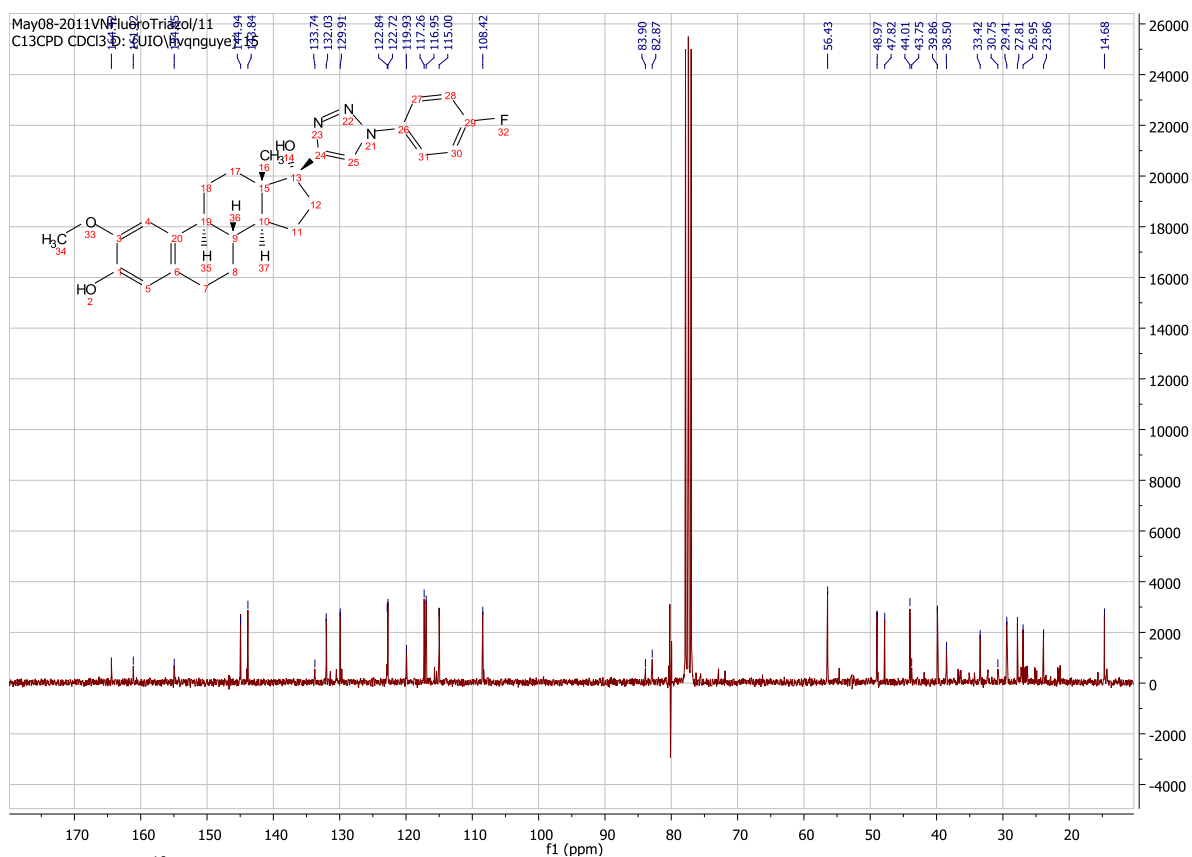
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.86 (s, 1H), 7.82 – 7.71 (m, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.81 (d, *J* = 3.1 Hz, 3H), 2.85 – 1.16 (m, 23H), 1.09 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 162.77 (d, *J* = 249.1 Hz), 154.95, 144.94, 143.84, 133.74, 132.03, 129.91, 122.78 (d, *J* = 8.6 Hz), 119.93, 117.11, 115.00, 108.42, 83.38 (d, *J* = 77.7 Hz), 56.43, 48.97, 47.82, 44.01, 39.86, 38.50, 33.42, 29.41, 27.81, 26.95, 23.86, 14.68.

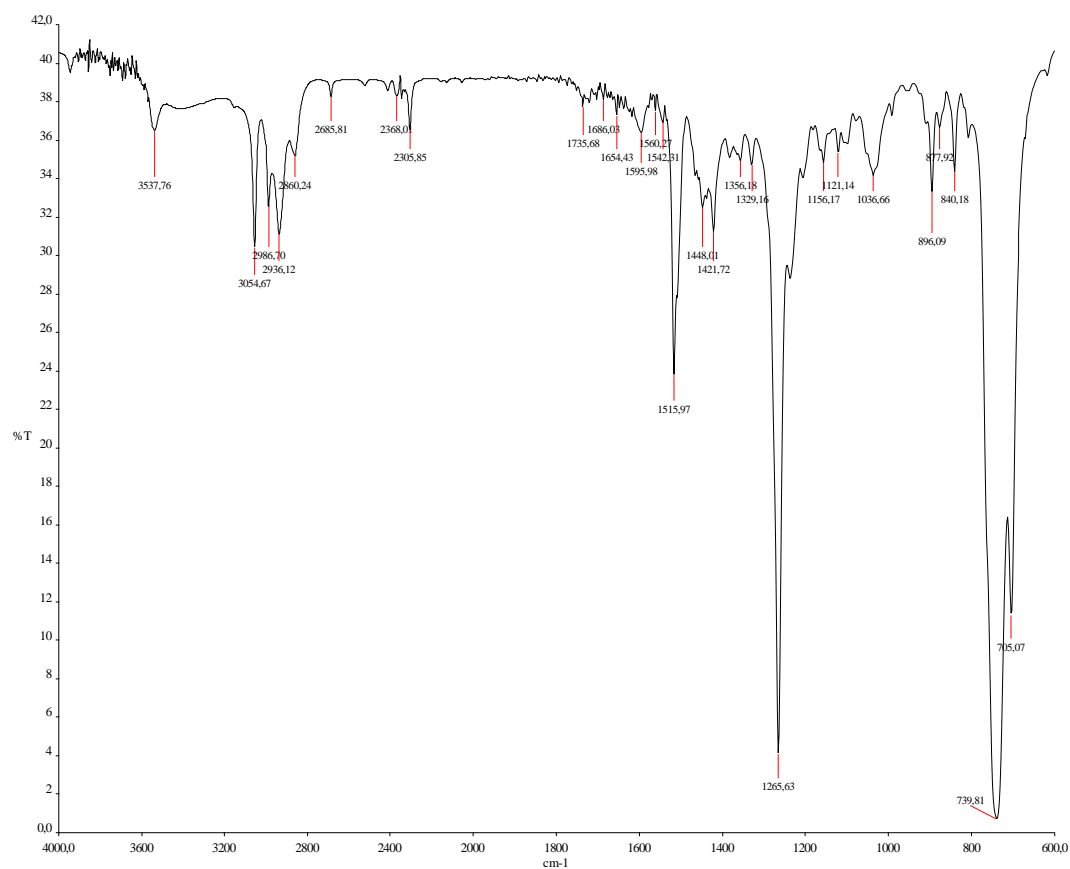
IR (Utvalgte topper): 3538 cm⁻¹, 1516 cm⁻¹

MS (EI): *m/z* = 463 (M⁺), 464 (M⁺+1)





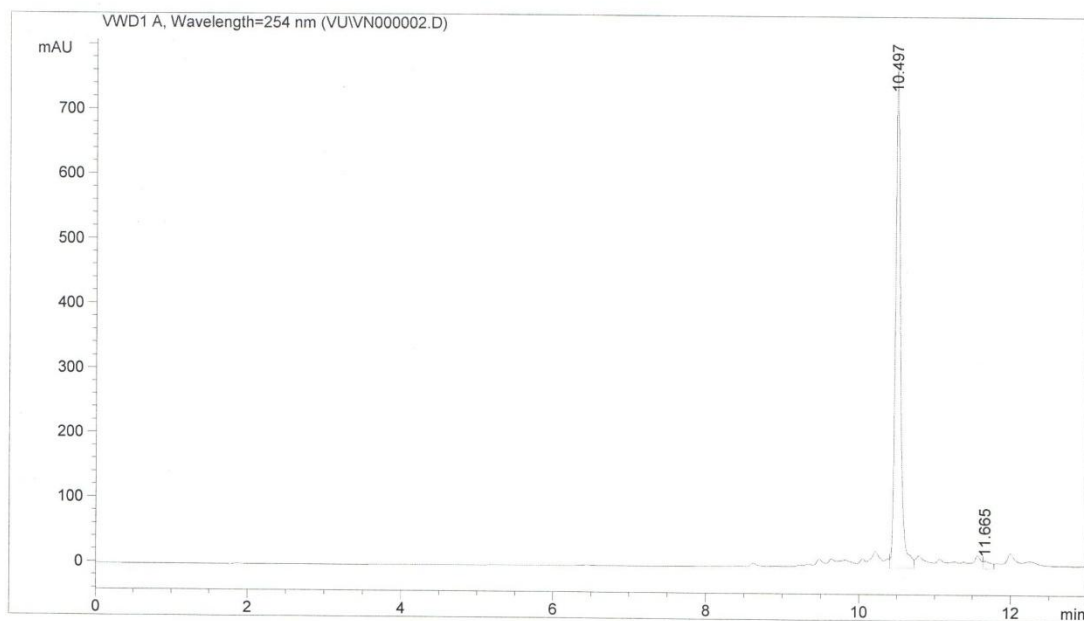
Spekter 9.40: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 50



Spekter 9.41: IR-spekter av forbindelse 50

Sample Name: VNTFluor

```
=====
Acq. Operator   : Vu
Acq. Instrument : Instrument 1          Location : Vial 1
Injection Date  : 13.05.2011 13:36:14
                                           Inj Volume : 5 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\SLOWER GRADIENT 13 MINUTES.M
Last changed    : 13.05.2011 13:35:04 by Vu
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\ALEXANDER\WASH.M
Last changed    : 08.03.2011 13:26:19 by Kumeet
Sample Info     :
=====
```



=====
Area Percent Report
=====

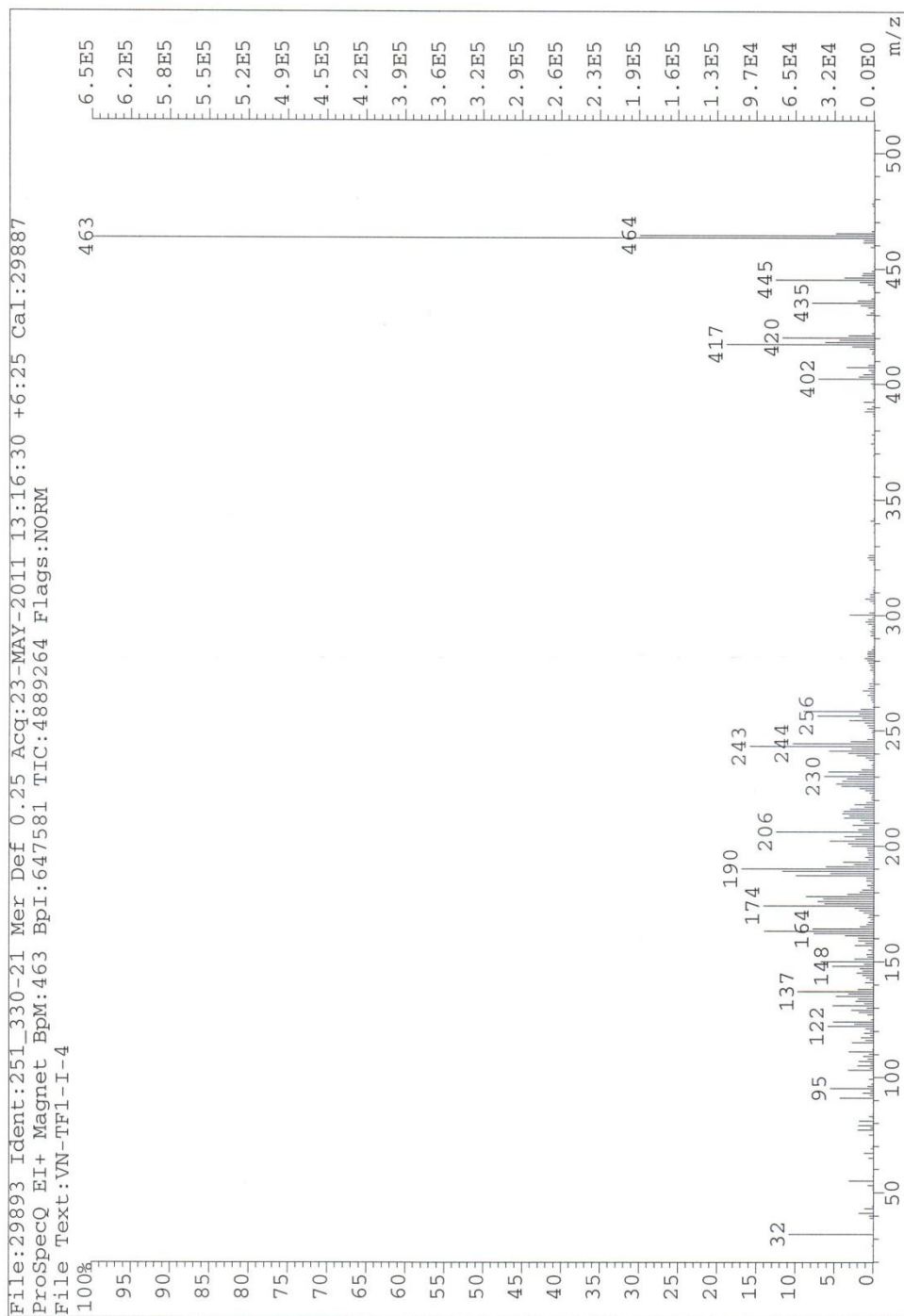
```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	10.497	VV	0.0699	3653.43945	770.10162	97.6245
2	11.665	VV	0.1013	88.90071	11.95455	2.3755

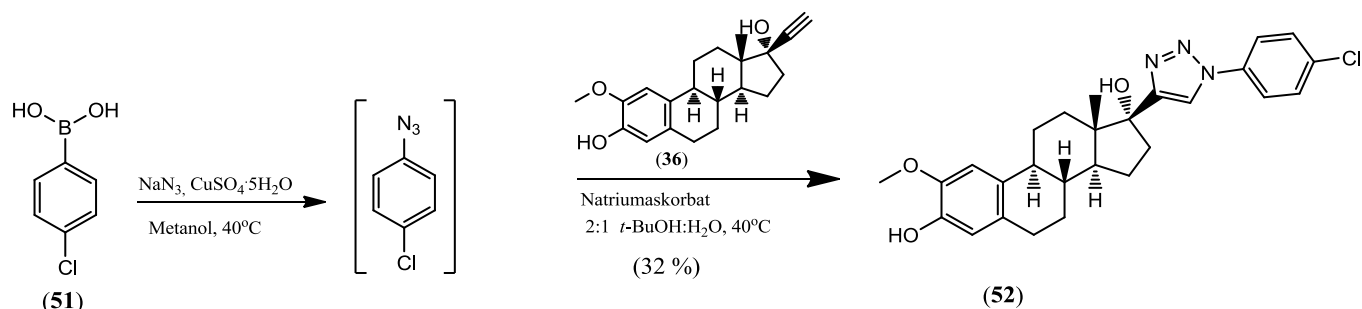
Totals : 3742.34016 782.05617

=====
*** End of Report ***



Spekter 9.43: MS-spekter av forbindelse **50**

9.15 Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 51	0,13	1,1	20 mg	-	156	-	-
NaN ₃	0,13	1,1	9 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,016	0,13	4 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	0,7	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,074	0,61	15 mg	-	198	-	-
Forbindelse 36	0,12	1	40 mg	-	326	-	-

NaN₃ (9 mg, 0,13 mmol), CuSO₄·5H₂O (4 mg, 0,016 mmol) og forbindelse **51** (20 mg, 0,13 mmol) ble løst i metanol 0,7 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (15 mg, 0,074 mmol) og forbindelse **36** (40 mg, 0,12 mmol).

Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt TLC ikke lengre viste noen tegn til forbindelse **36**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelse av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂. Denne organiske fasen ble dampet under redusert trykk på. Råproduktet ble rensed ved hjelp av kolonnekromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1; R_f = 0,32).

Det ble forsøkt å ta ^{13}C -NMR spekter med en frekvens på 300 MHz og 4096 skann, men dette ble ikke vellykket på grunn av lavt utbytte av forbindelse **52**. Derfor er det ingen karbonspekter for denne forbindelsen.

Data:

Utbytte: 12 %

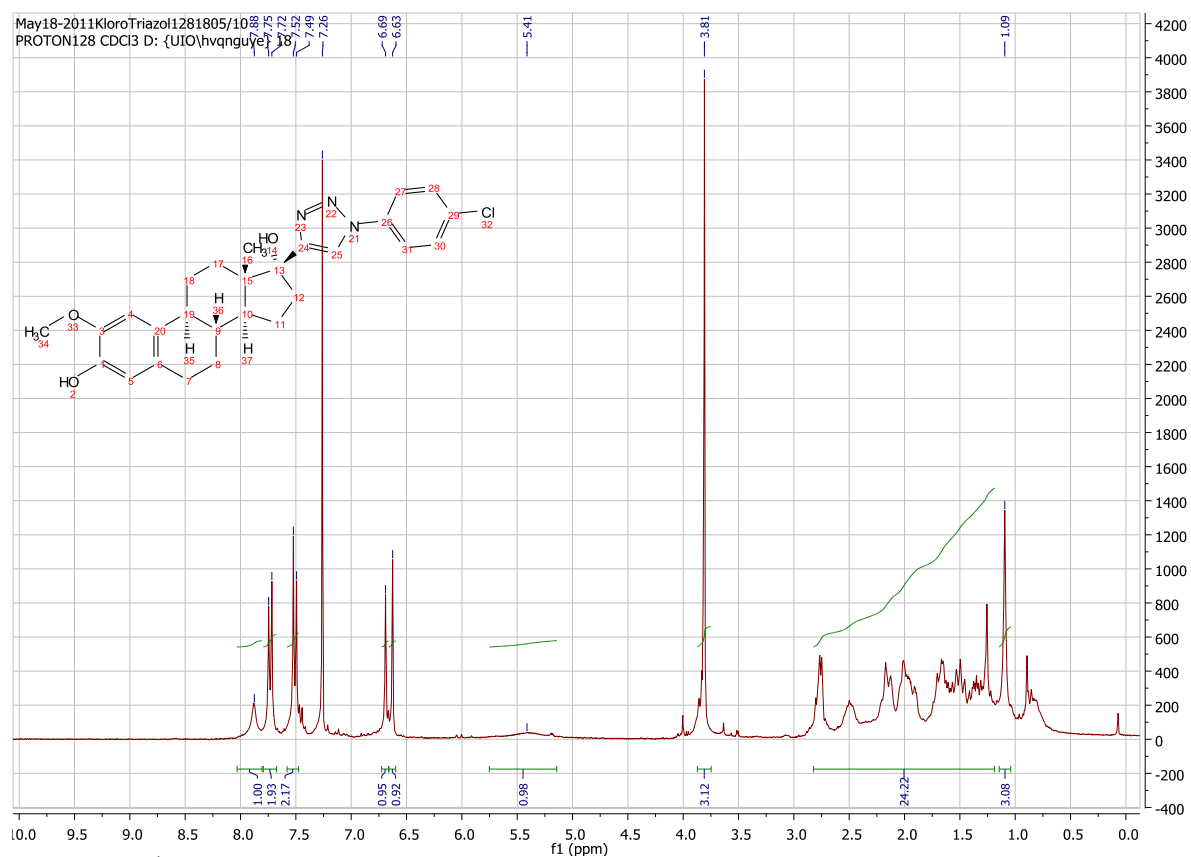
Smeltepunkt: 125-128 °C.

Produkt: Hvitt fast stoff

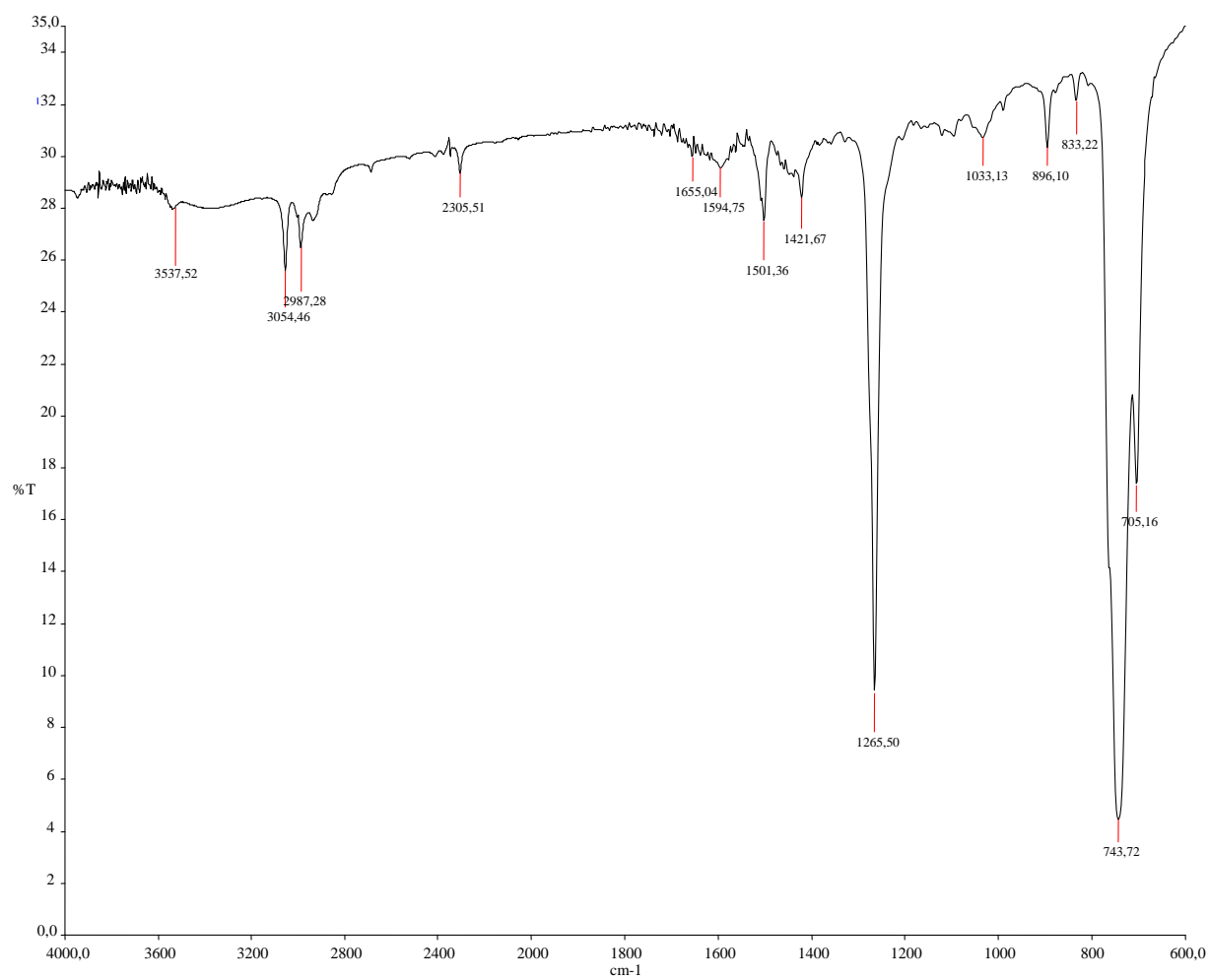
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.88 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.82 – 1.19 (m, 24H), 1.09 (s, 3H).

IR (Utvalgte topper): 3538 cm^{-1} , 1501 cm^{-1}

MS (EI): $m/z = 479$ (M^+), 481 ($\text{M}^+ + 1$)



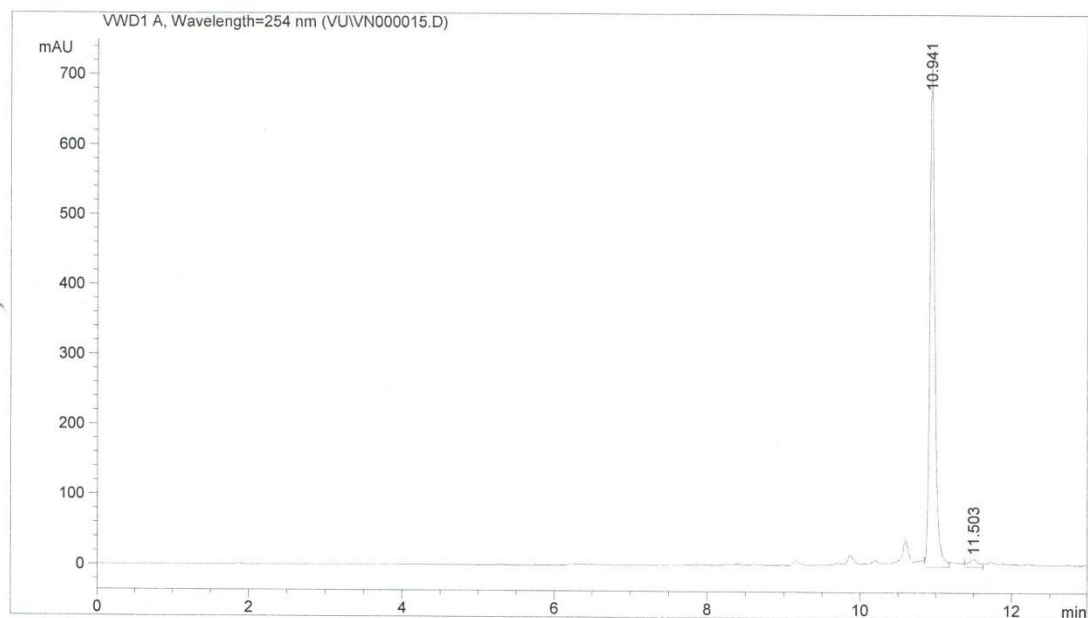
Spekter 9.44: ^1H -NMR spekter av forbindelse **52**



Spekter 9.45: IR-spekter av forbindelse **52**

ata File C:\CHEM32\1\DATA\VU\VN000015.D
Sample Name: VNTTert3

```
=====
Acq. Operator   : Vu
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date  : 17.05.2011 10:11:28
Location       : Vial 1
Inj Volume     : 5 µl
Method         : C:\CHEM32\1\DATA\CEZAR\SLOWER GRADIENT 13 MINUTES.M
Last changed    : 13.05.2011 13:35:04 by Vu
Sample Info     :
=====
```



=====
Area Percent Report
=====

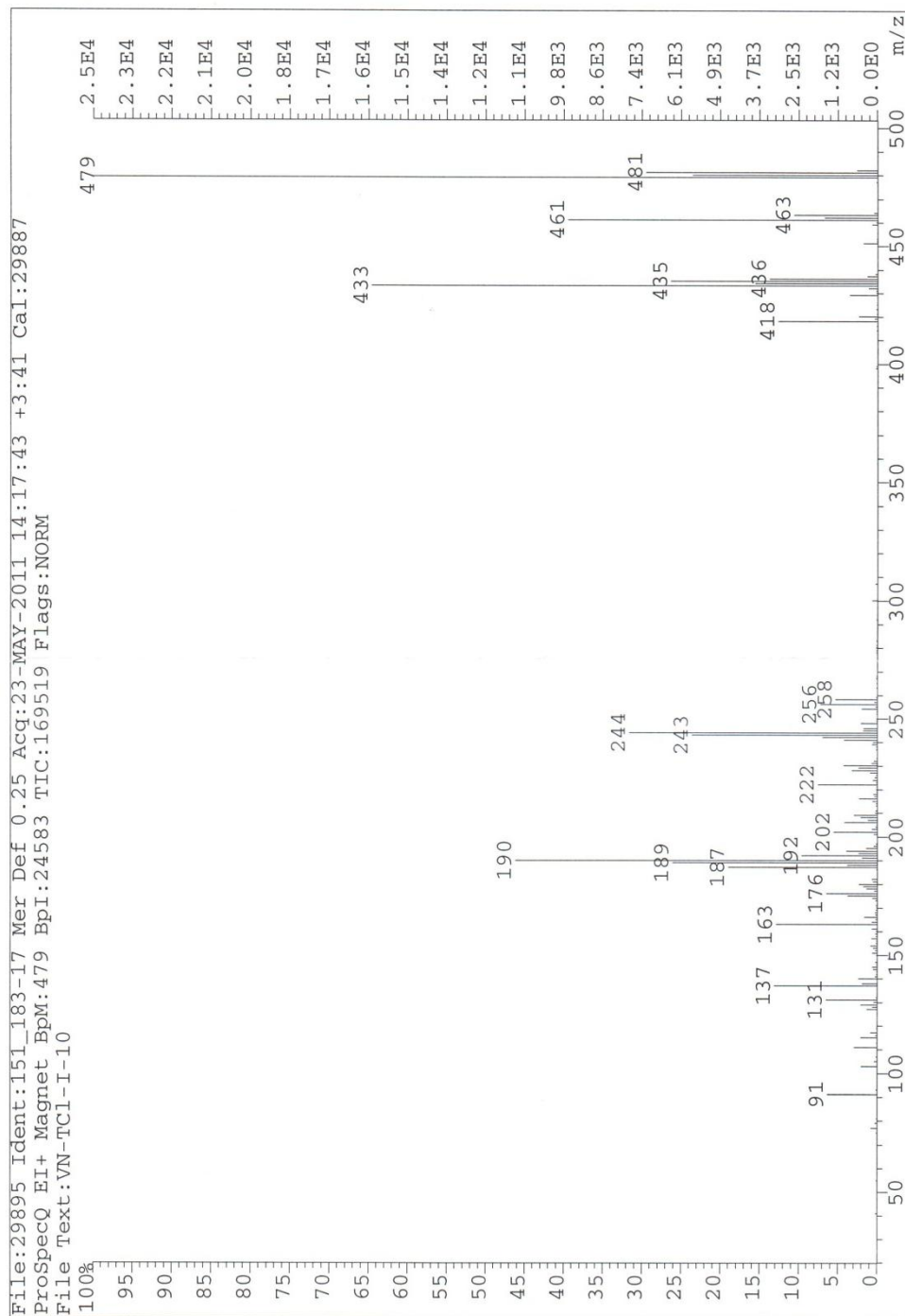
```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	10.941	VV	0.0709	3360.27393	714.41479	96.8077
2	11.503	VV	0.1343	110.80869	11.35258	3.1923

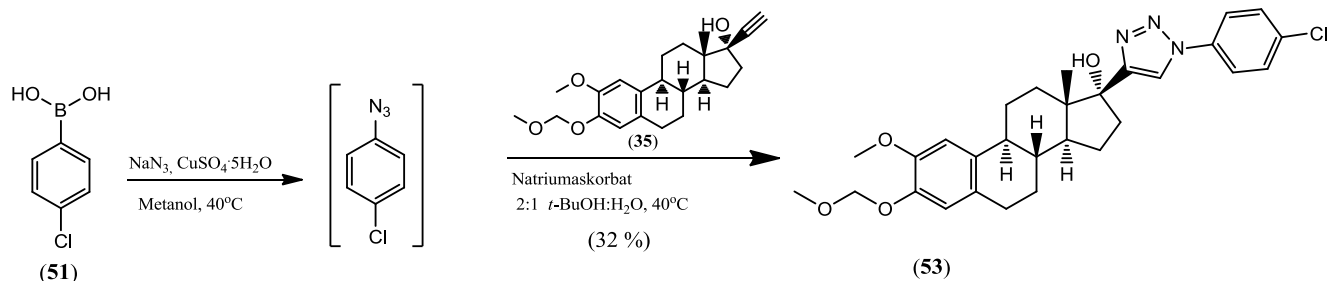
Totals : 3471.08261 725.76738

=====
*** End of Report ***



Spekter 9.47: MS-spekter av forbindelse 52

9.16 Forsøk på å syntetisere 2-metoksi-3-metoksimetyl-17-β-(1-*para*-kloro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol



Referanse: Tao, Chuan-Zhou, Cui, Xin, Li, Juan, Liu, Ai-Xiang, Liu, Lei, Guo, Qing-Xiang, *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 51	0,19	1,2	30 mg	-	156	-	-
NaN ₃	0,21	1,3	13,5 mg	-	65	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,018	0,11	4,5 mg	-	250	-	-
Metanol	-	-	-	0,7	32	0,79	65
<i>Tert</i> -butanol	-	-	-	2	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
Natriumaskorbat	0,083	0,51	16,5 mg	-	198	-	-
Forbindelse 35	0,16	1	60 mg	-	370	-	-

NaN₃ (13,5 mg, 0,21 mmol), CuSO₄·5H₂O (4,5 mg, 0,018 mmol) og forbindelse **51** (30 mg, 0,19 mmol) ble løst i metanol (0,7 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter varmet opp til 40 °C og ble rørt inntil inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Etter at aziddannelsen var fullført, ble reaksjonsblandingen avkjølt ved romtemperatur. Etter avkjølingen ble det tilsatt *t*-BuOH:H₂O (2:1 ml). Videre ble det tilsatt natriumaskorbat (16,5 mg, 0,083 mmol) og forbindelse **35** (60 mg, 0,16 mmol).

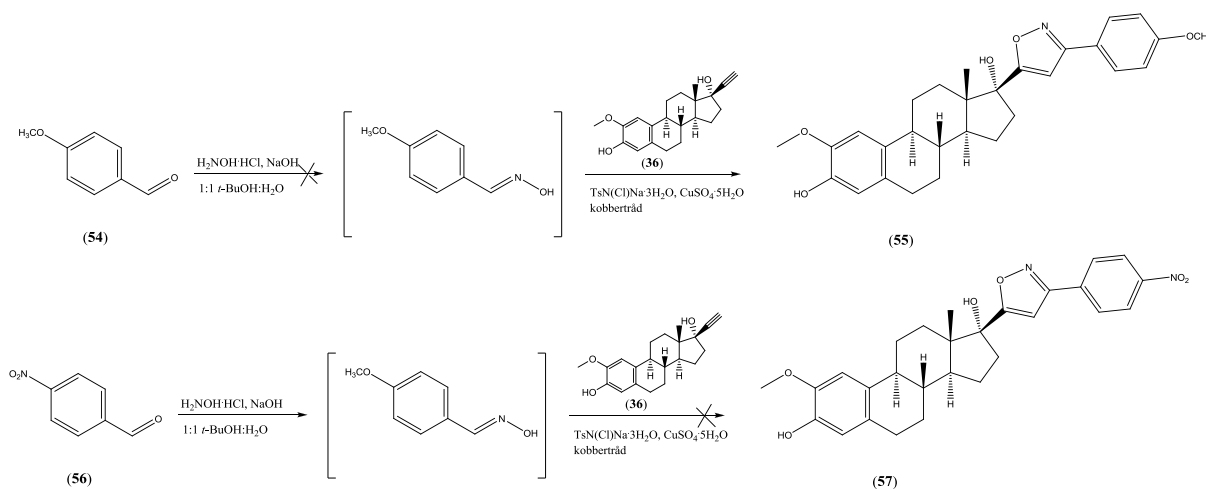
Blandingen ble så varmet opp til 40 °C og rørt inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til forbindelse **35**. Det ble tilsatt 10 % NH₄Cl (5 ml) og iskaldt H₂O (4 ml). Deretter ble det tilsatt litt is til blandingen. Dette førte til dannelsen av svart bunnfall. Blandingen med bunnfallet ble filtrert gjennom sintertraktet. Bunnfallet ble så samlet opp ved å filtrere det med CH₂Cl₂.

Denne organiske fasen ble dampet under redusert trykk. Råproduktet ble rensset ved hjelp av flashkromatografi (CH_2Cl_2 :EtOAc 9:1).

Kommentar til forsøket:

På grunn av problemer under rensingen ble ikke produktet isolert.

9.17 Forsøk på å syntetisere 3,5-disubstituert-isoksazol



Referanse: Hansen, Trond V, Wu, Peng, Fokin, Valery V., *J.Org.Chem* 2005, **70**(19):7761-7764.

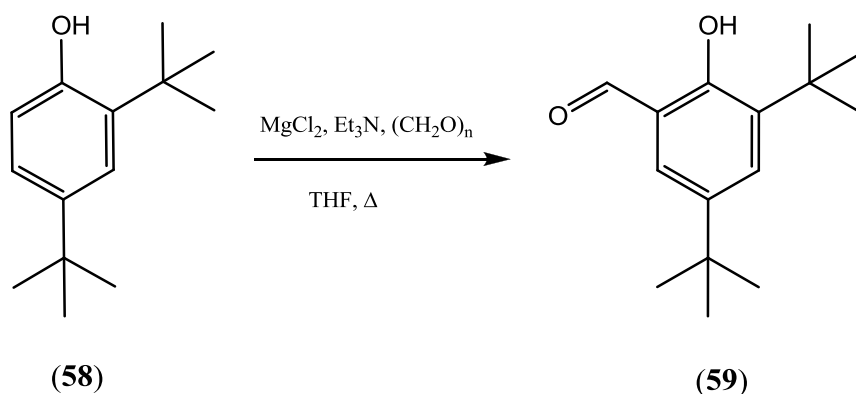
Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Aldehyd	0,24	1	-	-	-	-	-
H ₂ NOH·HCl	0,25	1,01	18 mg	-	69	-	-
Tert-butanol	-	-	-	1	74	0,78	82
H ₂ O	-	-	-	1	18	1	100
NaOH	0,25	1,01	10 mg	-	40	-	-
TsN(Cl)Na·3H ₂ O	0,25	1,01	70 mg	-	282	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	8·10 ⁻³	0,03	2 mg	-	250	-	-
Kobbertråd	-	-	3 mg	-	-	-	-
Forbindelse 36	0,24	1	78 mg	-	326	-	-

Hydroksylamin hydroklorid (18 mg, 0,25 mmol) ble tilsatt til en blanding som inneholdt 2 ml 1:1 *t*-BuOH:H₂O. Aldehydet (0,24 mmol) ble så tilsatt til denne blandingen. Videre ble NaOH tilsatt (10 mg, 0,25 mmol) til blandingen og rørt for 30 min ved romtemperatur til TLC viste at oksimdannelse er fullført. Deretter ble kloroamin-T trihydrat (70 mg, 0,25 mmol) tilsatt i små mengder over 5 min, og deretter ble CuSO₄·5H₂O (2 mg, 8 µmol) og kobbertråder (ca 3 mg) tilsatt. pH i blandingen ble justert til ca 6 med noen dråper av 1 M NaOH. Forbindelse 36 (78 mg, 0,24 mmol) ble så tilsatt. Blandingens ble rørt til TLC viste at isoksazol dannelsen ble fullført.

Reaksjonsblandingen ble så overført til en erlenmeyerkolbe som inneholder iskald vann (10 ml) og 10 % NH_4OH (5 ml) slik at kobber saltene blir fjernet. Produktet ble filtrert og løst med CH_2Cl_2 igjen og passert gjennom en plugg av silika.

9.18 Syntese av 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksybenzaldehyd



Referanse: Akselsen, Øyvind W., Skattebøl, Lars, Hansen, Trond Vidar, *Tetrahedron Letters* 2009, **50**(46):6339-6341.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
MgCl ₂	10	2	969 mg	-	95	-	-
Paraformaldehyd	15	3	454 mg	-	30	-	-
Trietylamin	-	-	-	1,4	101	0,73	89
Forbindelse 58	5	1	1,03 g	-	206	-	-
THF	-	-	-	25	72	0,89	66

I en tørr 50 ml, 2-halset rundkolbe montert med en kjøler og med en magnet, ble vannfri magnesiumklorid (969 mg, 10 mmol), paraformaldehyd (454 mg, 15 mmol), tørr trietylamin (1,4 ml), forbindelse **58** (1,03 g, 5 mmol) og tørr tetrahydrofuran (25 ml) tilsatt under nitrogenatmosfære. Blandingen ble så refluksert (70 °C) inntil inntil TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet. Blandingen ble så avkjølt på isbad i noen minutter. Etter at blandingen hadde blitt avkjølt ble blandingen kontrollert ved hjelp av TLC-analyse (heksan:EtOAc = 95:5). Dersom reaksjonen ikke var ferdig, skulle reflukseres i enda 1 time. Når reaksjonen ble ferdig ble det tilsatt eter (10 ml) til reaksjonsblandingen.. Reaksjonsblandingen ble deretter ekstrahert med 1N HCl (3x10 ml) og med vann (3x10 ml).

Den organiske fasen ble tørket over MgSO₄. Tørkemiddelet ble filtrert vekk med filterpapir og reaksjonsblandingen ble dampet under redusert trykk. Dette resulterte i et oransje oljeaktig råprodukt

Råproduktet ble videre rensset ved kolonnekromatografi (heksan:EtOAc 95:5; R_f = 0,43).

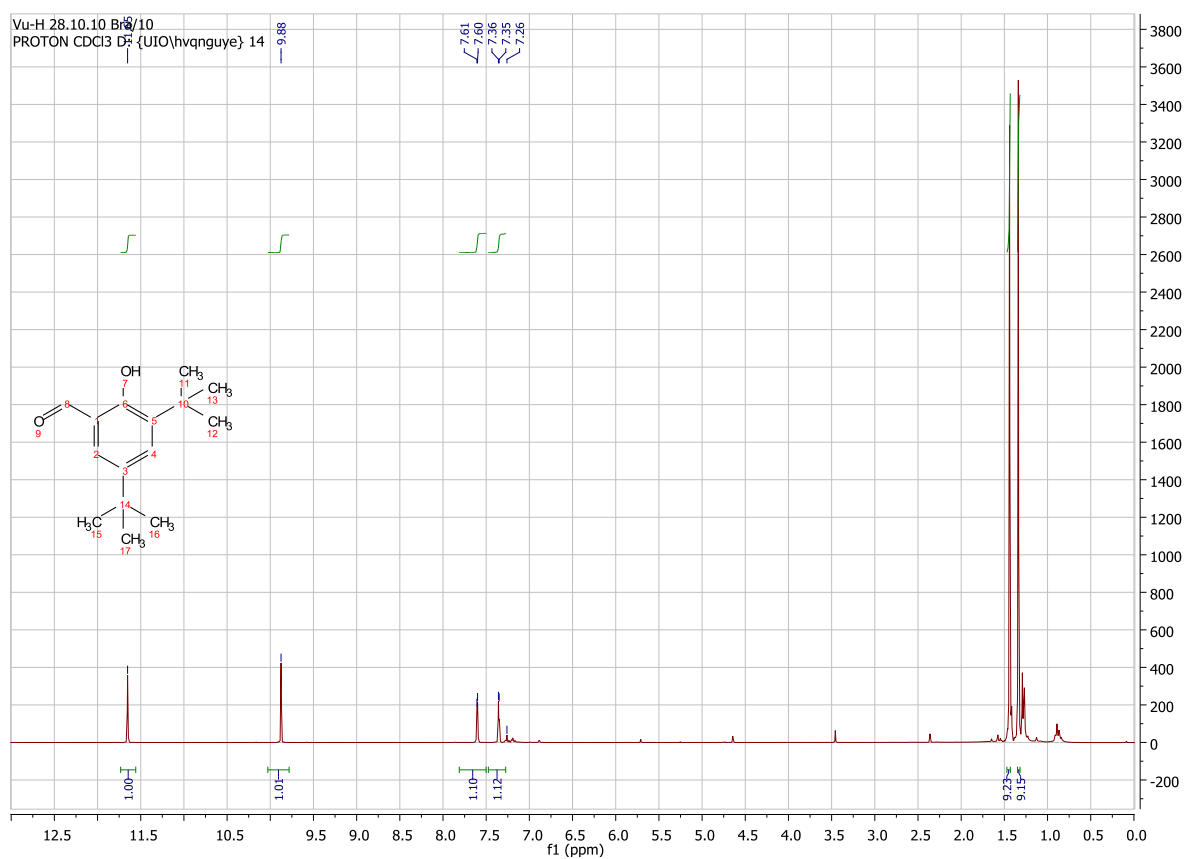
Data:

Utbytte: 46 %.

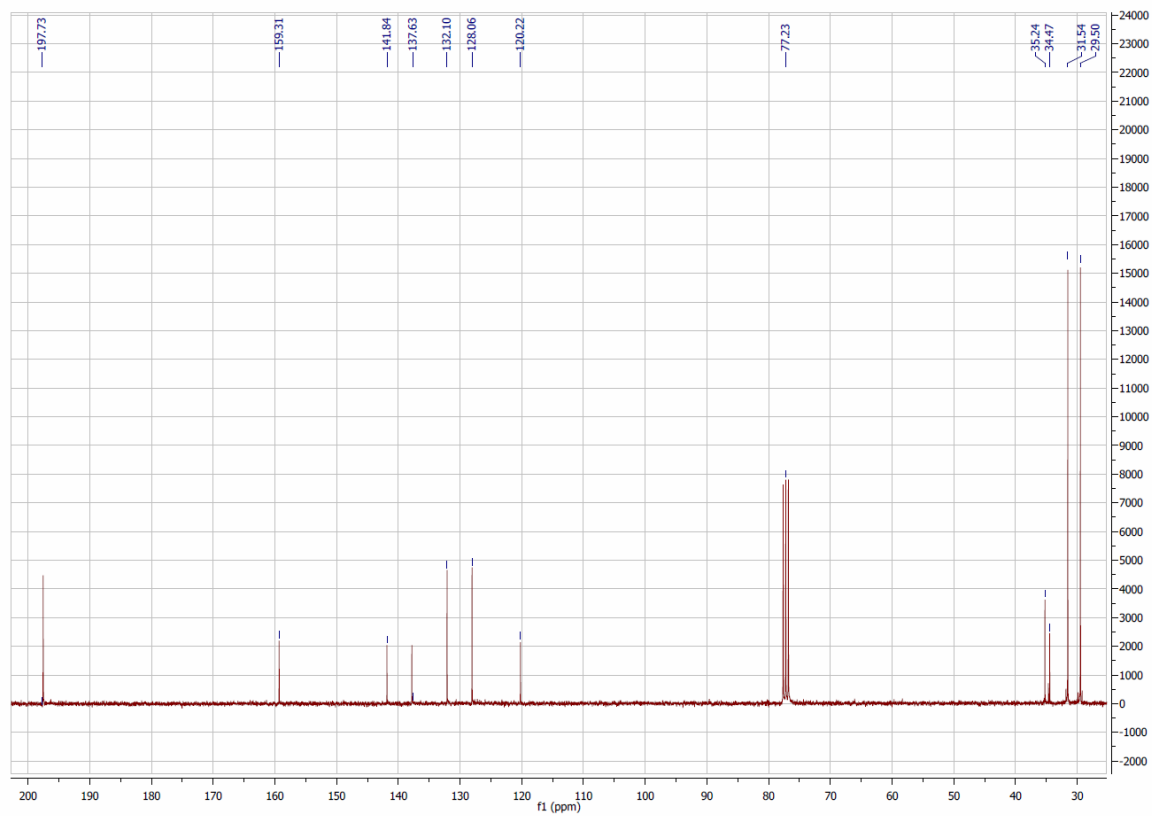
Produktet: Hvitt fast stoff

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 11.65 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 1.45 (d, $J = 6.7$ Hz, 9H), 1.34 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 197,73, 159,31, 141,84, 137,63, 132,10, 128,06, 120,22, 77,23, 35,24, 34,47, 31,54, 29,50.

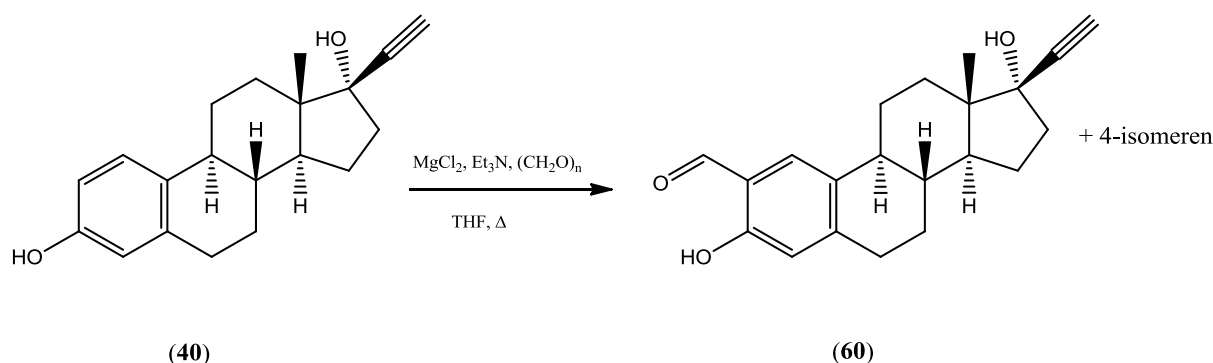


Spekter 9.48: ^1H -NMR spekter av forbindelse 59



Spekter 9.49 ^{13}C -NMR spekter av forbindelse **59**

9.19 Syntese av 17- β -etynyløstradiol-2-karbaldehyd



Referanse: Akselsen, Øyvind W., Hansen, Trond Vidar, *Supporting information for manuscript submitted to Tetrahedron*(2011)^[75].

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
MgCl ₂	3	3	285 mg	-	95	-	-
Paraformaldehyd	4	4	454 mg	-	30	-	-
Trietylamin	-	-	-	0,42	101	0,73	89
Forbindelse 40	1	1	1,03 g	-	206	-	-
THF	-	-	-	10	72	0,89	66

Til en tørr THF løsning (10 ml) av forbindelse **40** (296 mg, 1 mmol), ble vannfri magnesiumklorid (285 mg, 3 mmol), trietylamin (0,42 ml, 3 mmol) og paraformaldehyde (120 mg, 4 mmol) tilsatt under nitrogen. Blandingen ble så refluksert (70 °C) og avsluttet da TLC visten ingen tegn til startmaterialet. Blandingen ble så avkjølt til romtemperatur og avsluttet med 1M HCl løsning (15 ml). Blandingen ble ekstrahert med EtOAc (2 x 25 ml). Den samlede organiske fasen ble vasket med mettet NaCl-løsning og deretter tørket over MgSO₄. Blandingen ble videre dampet under redusert trykk. Dette resulterte i gul oljeaktig råprodukt.

Produktet ble rensert ved omkrystallisering med dietyleter.

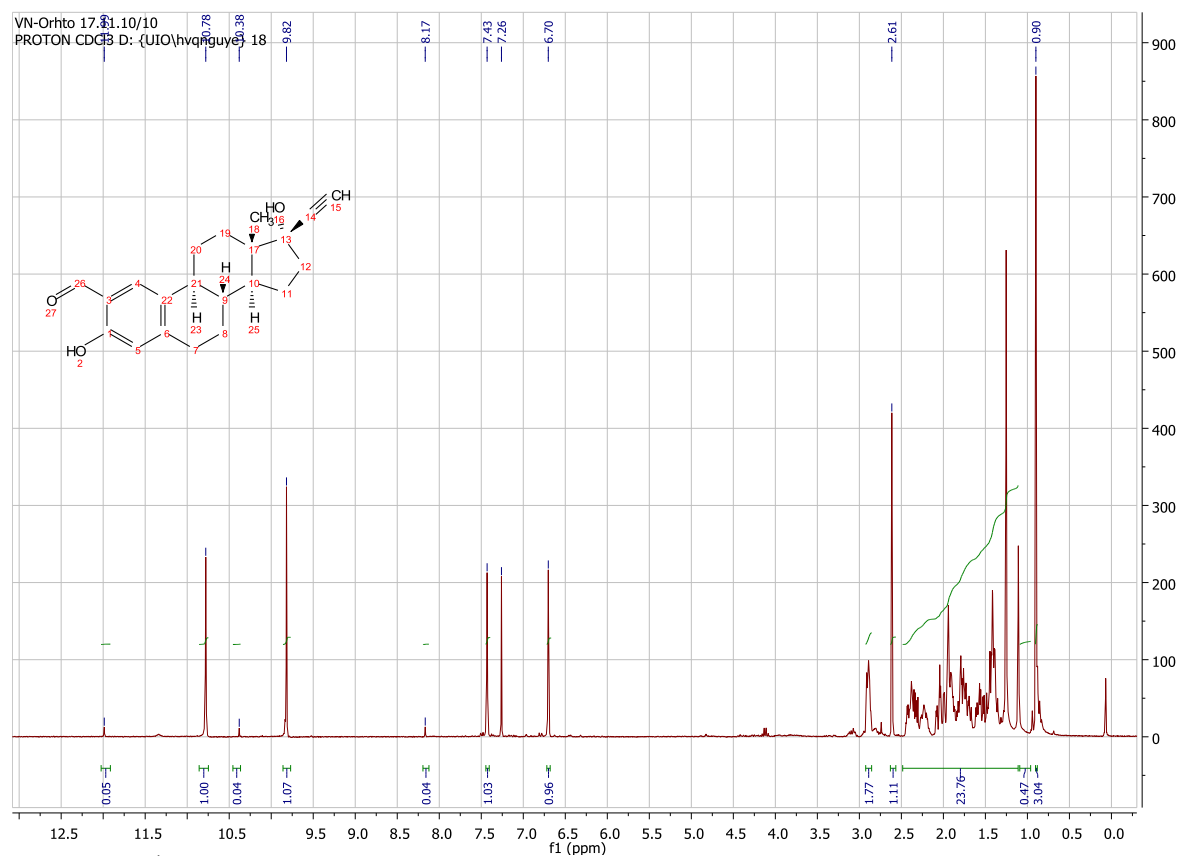
Det ble ikke tatt ¹³C-NMR spekter for forbindelse **60**

Data:

Utbytte: 74 %

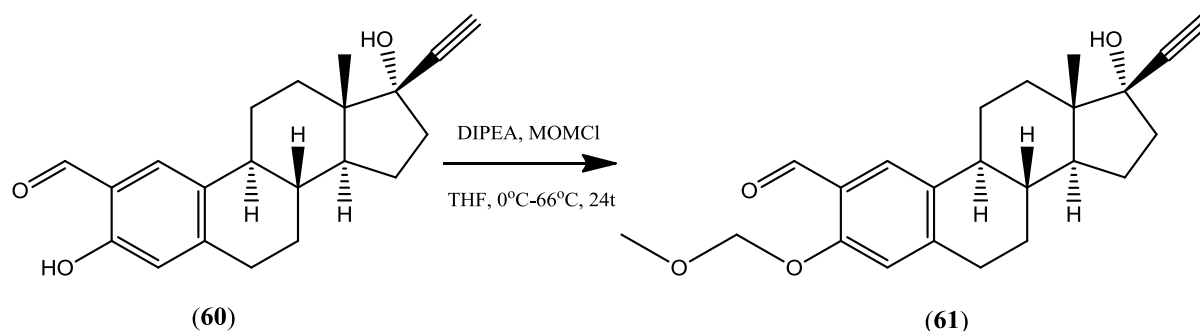
Produkt: Gult fast stoff

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 11.99 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 2.92 – 2.85 (m, 2H), 2.61 (s, 1H), 2.48 – 1.11 (m, 24H), 0.90 (s, 3H).



Spekter 9.50: ^1H -NMR-spekter av forbindelse **60**

9.20 Syntese av 3-metoksi-metyl-17-β-etynyløstradiol-karbaldehyd



Referanse:

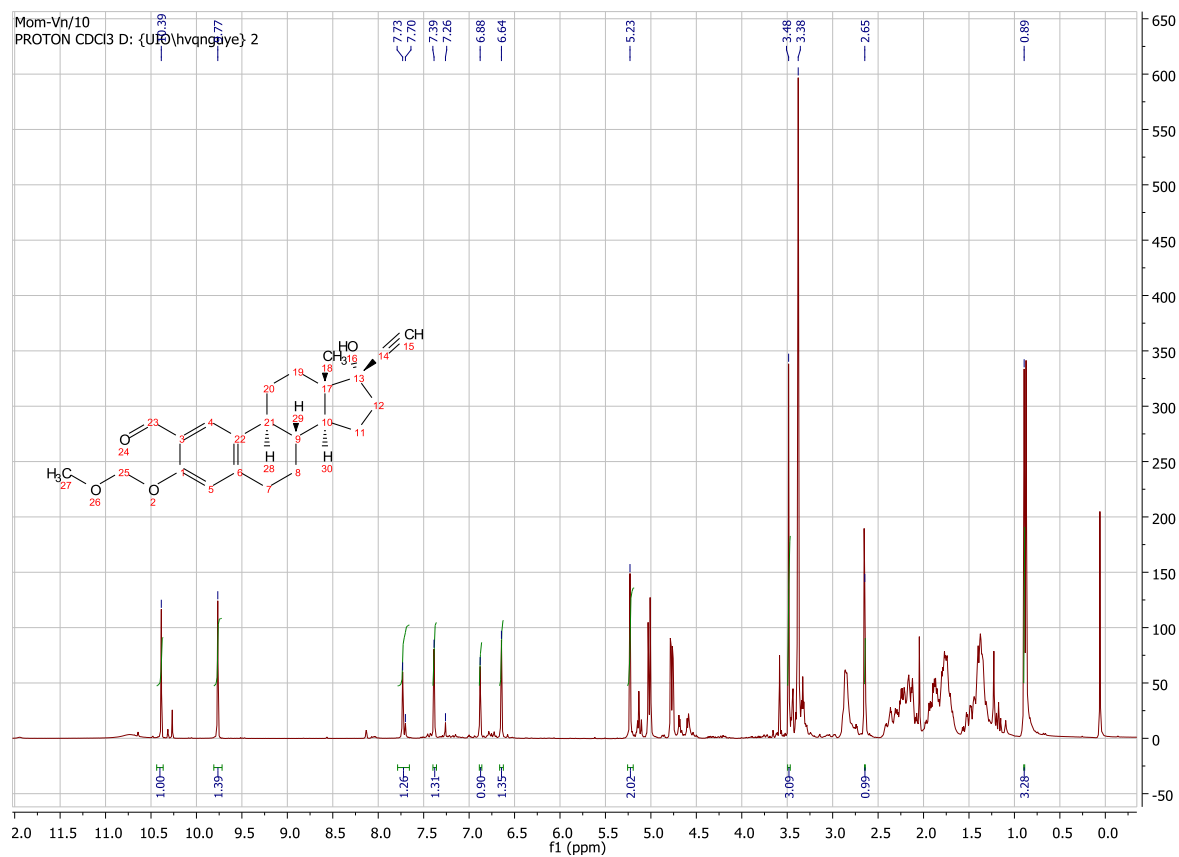
Edsall, Allison B., Mohanakrishnan, Arasambattu K., Yang, Donglai, Fanwick, Philip E., Hamel, Ernest, Hanson, Arthur D., Agoston, Gregory E., Cushman, Mark, *J. Med. Chem* 2004, **47**(21):5126-5139.

Fremgangsmåte:

Reagenser	mmol	Ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm ³)	k.p (°C)
Forbindelse 60	1	1	324 mg	-	300	-	-
DIPEA	2,5	2,5	-	0,43	129	0,74	127
MOMCl	2,5	2,5	-	0,20	81	1,06	57
THF	-	-	-	5	72	0,89	66

Forbindelse **60** (324 mg, 1,0 mmol) og tørr THF (5 ml) ble tilsatt i 50 ml rundkolbe. DIPEA (0,43 ml, 2,5 mmol) ble deretter tilsatt til blandingen. Blandingen ble så rørt ved 0 °C under nitrogen i 30 min. MOMCl (0,20 ml, 2,5 mmol) ble så tilsatt dråpevis til blandingen ved 0 °C. Blandingen ble videre varmet opp til romtemperatur i 1 time og deretter ble den refluksert (70-75 °C) i ca. 24 timer. Da TLC ikke lengre viste noen tegn til startmaterialet ble blandingen avkjølt til romtemperatur. Etter avkjølingen ble H₂O (10 ml) og EtOAc (10 ml) tilsatt til blandingen og ble ekstrahert. Vannfasen ble videre ekstrahert med EtOAc (2 x 5 ml). Den samlede organiske fasen ble ekstrahert med 10 % eddiksyre (2 x 10 ml). Organiske fasen ble overført til begerglass og mettet NaHCO₃ (10 ml) ble tilsatt. Blandingen ble rørt inntil ingen tegn til gassutvikling. Denne blandingen ble vasket med mettet NaCl-løsning (15 ml) og tørket over MgSO₄. Blandingen ble dampet under redusert trykk. Dette førte til en oransje

oljeaktig råprodukt, som senere ble renset ved hjelp av kolonnnekromatografi (heksan:EtOAc 9:3; R_f : 0,37).



Spekter 9.51: $^1\text{H-NMR}$ spekter av forbindelse **61**. Dette spekteret inneholder blanding av forbindelse **60** og **61**

10 Litteraturliste

1. Gordaliza M: **Natural products as leads to anticancer drugs**. *Clinical and Translational Oncology* 2007, **9**(12):767-776.
2. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M: **The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents**. *Cancer Research* 1963, **23**:1390-1427.
3. Imbert TF: **Discovery of podophyllotoxins**. *Biochimie* 1998, **80**(3):207-222.
4. Cragg GM, Newman DJ: **Plants as a source of anti-cancer agents**. *Journal of Ethnopharmacology* 2005, **100**(1-2):72-79.
5. Kingston DGI: **Taxol, a Molecule for All Seasons**. *Chemical Communications* 2001(10):867-880.
6. Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT: **Tubulin as a target for anticancer drugs: Agents which interact with the mitotic spindle**. *Medicinal Research Reviews* 1998, **18**(4):259-296.
7. Lakhani NJ, Sarkar MA, Venitz J, Figg WD: **2-Methoxyestradiol, a Promising Anticancer Agent**. *Pharmacotherapy* 2003, **23**(2):165-172.
8. Morgan DO: **The cell cycle: principles of control**. London: NSP/Oxford University Press; 2007:s. 4-8.
9. Morgan DO: **The cell cycle: principles of control**. London: NSP/Oxford University Press; 2007:s. 88-90.
10. Bolsover SR, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG: **Cell biology: a short course**. Hoboken: Wiley-Liss; 2004: s. 402-404.
11. Morgan DO: **The cell cycle: principles of control**. London: NSP/Oxford University Press; 2007:s. 27-30.
12. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, : **Essential cell biology**. New York: Garland Science; 2004:s. 611-616.
13. **Regulation of apoptosis in the female reproductive system**
[<http://herkules.oulu.fi/isbn9514266676/html/i267388.html>]
14. Bolsover SR, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG: **Cell biology: a short course**. Hoboken: Wiley-Liss; 2004:s. 415-416.
15. Morgan DO: **The cell cycle: principles of control**. London: NSP/Oxford University Press; 2007:s. 224-225.
16. Alberts B: **Essential cell biology**. New York: Garland Science; 2004:s. 632.
17. Morgan DO: **The cell cycle: principles of control**. London: NSP/Oxford University Press; 2007:s. 248-256.
18. **Kreft-1** [http://www.snl.no/sml_artikkel/svulst]
19. Karp G: **Cell and molecular biology: concepts and experiments**. New Jersey: John Wiley; 2007:s. 662-676.
20. Cutter MA, Sigstedt J, Venne V: **Cell Biology and Cancer**. Colorado: BSCS; 1999:s. 5.
21. Bolsover SR, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG: **Cell biology: a short course**. Hoboken: Wiley-Liss; 2004:s. 381-385.
22. Altmann K-H, Gertsch J: **Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents**. *Natural Product Reports* 2007, **24**(2):327-357.
23. Morgan DO: **The cell cycle: principles of control**. London: NSP/Oxford University Press; 2007:s. 114-115.
24. **Tubulinhemmere**
[http://cytostatikaboken.moses.no/index.php?seks_id=2297&path=1761|&element=Kapittel]
]
25. Kenny PA, Bozzone DM: **Stages of cancer development**. New York: Chelsea House; 2007:s. 46-49.

26. Adair TH, Montani JP: **Angiogenesis**. San Rafael CA: 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences; 2010:s 3-4.
27. Kalluri R: **Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis**. *Nature Reviews Cancer* 2003, **3**(6):422-433.
28. Folkman J: **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease**. *Natural Medicine* 1995, **1**(1):27-30.
29. Edsall AB, Mohanakrishnan AK, Yang D, Fanwick PE, Hamel E, Hanson AD, Agoston GE, Cushman M: **Effects of Altering the Electronics of 2-Methoxyestradiol on Cell Proliferation, on Cytotoxicity in Human Cancer Cell Cultures, and on Tubulin Polymerization**. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004, **47**(21):5126-5139.
30. Agoston GE, Shah JH, Suwandi L, Hanson AD, Zhan X, LaVallee TM, Pribluda V, Treston AM: **Synthesis, antiproliferative, and pharmacokinetic properties of 3- and 17-double-modified analogs of 2-methoxyestradiol**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2009, **19**(21):6241-6244.
31. Chilman-Blair K: **2-Methoxyestradiol**. *Drugs of the Future* 2003, **28**(11):1064-1069.
32. Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, Giannakakou P: **2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF**. *Cancer Cell* 2003, **3**(4):363-375.
33. Mueck AO, Seeger H: **2-Methoxyestradiol--biology and mechanism of action**. *Steroids* 2010, **75**(10):625-631.
34. Mooberry SL: **New insights into 2-methoxyestradiol, a promising antiangiogenic and antitumor agent**. *Current Opinion in Oncology* 2003, **15**(6):425-430.
35. Sutherland TE, Anderson RL, Hughes RA, Altmann E, Schuliga M, Ziogas J, Stewart AG: **2-Methoxyestradiol--a unique blend of activities generating a new class of anti-tumour/anti-inflammatory agents**. *Drug discovery today* 2007, **12**(13-14):577-584.
36. Cushman M, He HM, Katzenellenbogen JA, Lin CM, Hamel E: **Synthesis, antitubulin and antimitotic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site**. *Journal of Medicinal Chemistry* 1995, **38**(12):2041-2049.
37. Suwandi LS, Agoston GE, Shah JH, Hanson AD, Zhan XH, LaVallee TM, Treston AM: **Synthesis and antitumor activities of 3-modified 2-methoxyestradiol analogs**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2009, **19**(22):6459-6462.
38. Miller TA, Bulman AL, Thompson CD, Garst ME, Macdonald TL: **Synthesis and Structure-Activity Profiles of A-Homoestrans, the Estratropones**. *Journal of Medicinal Chemistry* 1997, **40**(23):3836-3841.
39. Verdier-Pinard P, Wang Z, Mohanakrishnan AK, Cushman M, Hamel E: **A Steroid Derivative with Paclitaxel-Like Effects on Tubulin Polymerization**. *Molecular Pharmacology* 2000, **57**(3):568-575.
40. Rao PN, Cessac JW, Tinley TL, Mooberry SL: **Synthesis and antimitotic activity of novel 2-methoxyestradiol analogs**. *Steroids* 2002, **67**(13-14):1079-1089.
41. Cushman M, He H-M, Katzenellenbogen JA, Varma RK, Hamel E, Lin CM, Ram S, Sachdeva YP: **Synthesis of Analogs of 2-Methoxyestradiol with Enhanced Inhibitory Effects on Tubulin Polymerization and Cancer Cell Growth**. *Journal of Medicinal Chemistry* 1997, **40**(15):2323-2334.
42. Tinley TL, Leal RM, Randall-Hlubek DA, Cessac JW, Wilkens LR, Rao PN, Mooberry SL: **Novel 2-methoxyestradiol analogues with antitumor activity**. *Cancer Research* 2003, **63**(7):1538-1549.
43. Rao PN, Cessac JW, Boyd JW, Hanson AD, Shah J: **Synthesis and antimitotic activity of novel 2-methoxyestradiol analogs--Part II**. *Steroids* 2008, **73**(2):158-170.
44. Agoston GE, Shah JH, LaVallee TM, Zhan X, Pribluda VS, Treston AM: **Synthesis and structure-activity relationships of 16-modified analogs of 2-methoxyestradiol**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2007, **15**(24):7524-7537.

45. Shah JH, Agoston GE, Suwandi L, Hunsucker K, Pribluda V, Zhan XH, Swartz GM, LaVallee TM, Treston AM: **Synthesis of 2- and 17-substituted estrone analogs and their antiproliferative structure-activity relationships compared to 2-methoxyestradiol.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2009, **17**(20):7344-7352.
46. Rao PN, Cessac JW, Boyd JW, Hanson AD, Shah J: **Synthesis and antimitotic activity of novel 2-methoxyestradiol analogs. Part III.** *Steroids* 2008, **73**(2):171-183.
47. Smith DA: **Metabolism, pharmacokinetics and toxicity of functional groups: impact of the building blocks of medicinal chemistry on ADMET.** Cambridge: RSC Publ.; 2010:s. 328-335.
48. Aasen JA: **Legemiddelkjemi 1: PKL 221-FRM 1050 - Tilleggshefte.** Oslo: Farmasøytisk Institutt; 2007:s. 43.
49. Waldo JP, Larock RC: **Synthesis of Isoxazoles via Electrophilic Cyclization.** *Organic Letters* 2005, **7**(23):5203-5205.
50. Bianchi L, Dell'Erba C, Gabellini A, Novi M, Petrillo G, Tavani C: **Access to 3-arylmethyl-5-(methylthio)isoxazoles via an initial ring-opening of 2-methylthio-4-nitrothiophene.** *Tetrahedron Letters* 2002, **58**(17):3379-3385.
51. Hansen TV, Wu P, Fokin VV: **One-Pot Copper(I)-Catalyzed Synthesis of 3,5-Disubstituted Isoxazoles.** *The Journal of Organic Chemistry* 2005, **70**(19):7761-7764.
52. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB: **Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.** *Angewandte Chemie International Edition* 2001, **40**(11):2004-2021.
53. Tao C-Z, Cui X, Li J, Liu A-X, Liu L, Guo Q-X: **Copper-catalyzed synthesis of aryl azides and 1-aryl-1,2,3-triazoles from boronic acids.** *Tetrahedron Letters* 2007, **48**(20):3525-3529.
54. Verley A: **Aluminum Alkoxide Reductio.** *Bulletin de la Societe Chimique de France* 1925(37):871.
55. Ponndorf W: **Aluminum Alkoxide Reduction.** *Angewandte Chemie International Edition* 1926(39):138.
56. Oppenauer RV: **Oppenauer oxidation.** *Rec Trav Chim* 1937(56):137.
57. Meijer R: **The winding road from Oppenauer to sustainable catalytic oxidations of alcohols.** Technische Universiteit Eindhoven; 2002.
58. Li JJ: **Oppenauer oxidation.** In *Name Reactions*. Springer Berlin Heidelberg; 2006:434-435.
59. Moses JE, Moorhouse AD: **The growing applications of click chemistry.** *Chemical Society Reviews* 2007, **36**(8):1249-1262.
60. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB: **A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes.** *Angewandte Chemie International Edition* 2002, **41**(14):2596-2599.
61. Hein C, Liu X-M, Wang D: **Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences.** *Pharmaceutical Research* 2008, **25**(10):2216-2230.
62. Solomons TWG, Fryhle CB: **Organic chemistry.** 8 edition. Hoboken, N.J.: Wiley; 2004:s. 553-562.
63. Solomons TWG, Fryhle CB: **Organic chemistry.** Hoboken, N.J.: Wiley; 2004:s. 736-737.
64. Wuts PGM, Greene TW: **Greene's protective groups in organic synthesis.** Hoboken, N.J.: Wiley; 2007: s.1.
65. Wuts PGM, Greene TW: **Greene's protective groups in organic synthesis.** Hoboken, N.J.: Wiley; 2007:s. 24-28.
66. Solomons TWG, Fryhle CB: **Organic chemistry.** Hoboken, N.J.: Wiley; 2004:s. 679-688.
67. Volz N, Broehmer MC, Toraeng J, Nieger M, Braese S: **Adventures in Heterocycle Chemistry: The Oxa-Michael Cascade for the Synthesis of Complex Natural Products and Highly Functionalized Bioactive Compounds.** *Indian Journal of Chemistry* 2009, **48**(13):1699-1703.
68. Akselsen ØW, Skattebøl L, Hansen TV: **Ortho-Formylation of oxygenated phenols.** *Tetrahedron Letters* 2009, **50**(46):6339-6341.
69. Hofsløkken NU, Skattebøl L: **Convenient Method for the ortho-Formylation of Phenols.** *Acta Chemica Scandinavica* 1999, **53**(4):258-262.

70. Hanson JR: **Steroids: partial synthesis in medicinal chemistry**. *Natural Product Reports* 2010, **27**(6):887-899.
71. Jourdan F, Bubert C, Leese MP, Smith A, Ferrandis E, Regis-Lydi S, Newman SP, Purohit A, Reed MJ, Potter BVL: **Effects of C-17 heterocyclic substituents on the anticancer activity of 2-ethylestra-1,3,5(10)-triene-3-O-sulfamates: synthesis, in vitro evaluation and computational modelling**. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2008, **6**(22):4108-4119.
72. Luo HB, Xie YY: **Regioselective Oxidation of Phenols to o-Quinones with Dess-Martin Periodinane(DMP)**. *Chinese Chemical Letters* 2003, **14**(6):s. 555-556.
73. Luzzio FA, Fitch RW, Moore WJ, Mudd KJ: **A Facile Oxidation of Alcohols Using Pyridinium Chlorochromate/Silica Gel**. *Journal of Chemical Education* 1999, **76**(7):974-975.
74. Breitmaier E: **Structure elucidation by NMR in organic chemistry: a practical guide**. Chichester: Wiley; 2002:s. 1-32.
75. Akselsen ØW, Hansen TV: **Regioselective Synthesis of 2-Formyl Estrone Derivatives**. *Supporting Information for manuscript submitted to Tetrahedron (2011)* 2010:s. 1-32.